



***In vitro*-Simulation der Funktion von Adhäsionsmolekülen im
Prozess der hämatogenen Metastasierung von Tumorzellen und
deren Inhibition durch Heparin**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Juliane Fritzsche
aus Dessau

Bonn, Mai 2008

Man sieht oft etwas hundertmal, tausendmal,
ehe man es zum ersten Mal richtig sieht.

Christian Morgenstern

Meiner Familie gewidmet.

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Referent: Prof. Dr. G. Bendas

Korreferent: Prof. Dr. K. Mohr

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2008

Diese Schrift ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2008

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Gerd Bendas angefertigt. Ich danke ihm herzlich für die Überlassung des überaus interessanten Forschungsthemas. Stete Unterstützung und die Offenheit für Fragen und Diskussionen trugen maßgeblich zum Gelingen der Arbeit bei. Ich danke ihm für das in mich gesetzte Vertrauen und die Möglichkeit der selbständigen Bearbeitung.

Prof. Dr. Klaus Mohr sei für die Übernahme des Zweitgutachtens herzlich gedankt. Bei Prof. Dr. Alf Lamprecht und Prof. Dr. Jörn Piel möchte ich mich für die Mitwirkung in der Prüfungskommission bedanken.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Susanne Alban für die Synthese und Überlassung der Testsubstanzen sowie zahlreiche Diskussionen, die einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben. Dr. Ralf J. Ludwig möchte ich für die Durchführung der *in vivo*-Versuche und für die Option danken, deren Ergebnisse präsentieren zu können.

Bei Dr. med. Hans Hünerbein (Niederkassel), Dr. med. Peter May (Bonn) sowie Dr. med. Elisabeth Schmidt-Recker (Bonn) bedanke ich mich für die Bereitstellung der Blutproben.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern des Arbeitskreises um Prof. Dr. Gerd Bendas danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit und Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Bei Dr. Katrin Christ und Dirk Simonis möchte ich mich für die kollegiale Arbeitsatmosphäre im gemeinsamen Labor bedanken. Dipl.-Pharm. Ingrid Hünerbein und Dipl.-Pharm. Michaela L. Krieger gebührt Dank für die gelungene Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeiten. Dr. Gabriele Schumacher danke ich für die Betreuung in der Anfangsphase meiner Arbeit.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises um Prof. Dr. Michael Wiese danke ich für das nette Arbeitsklima. An dieser Stelle seien besonders Dipl.-Pharm. Kerstin Breitbach-Genau, Björn Conrads und Dipl.-Pharm. Katja Sterz zu nennen, die mir bei der Durchführung von durchflusszytometrischen Analysen hilfreich zur Seite standen. Ein großes Dankeschön geht an Dr. Henrik Müller, der mir im Rahmen der Betreuung der Pharmaziestudierenden eine große Hilfe war.

Dem Graduiertenkolleg 677 „Struktur und molekulare Interaktion als Basis der Arzneimittelwirkung“ möchte ich für die Möglichkeit des Erfahrungsaustausches sowie die finanzielle Unterstützung danken.

Einen großen Dank spreche ich meinen Eltern Dipl.-Med. Rita Fritzsche und Dipl.-Ing. Reiner Fritzsche sowie meinem Bruder Matthias Fritzsche aus, ohne deren Unterstützung ich diese Arbeit nicht hätte anfertigen können.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abkürzungen für Aminosäuren.....	IX
1 Einleitung.....	1
2 Theoretischer Teil.....	2
2.1 Selektine und Liganden.....	2
2.1.1 Struktureller Aufbau und Expression der Selektine.....	2
2.1.1.1 E-Selektin.....	4
2.1.1.2 L-Selektin.....	4
2.1.1.3 P-Selektin.....	5
2.1.2 Selektinliganden.....	5
2.1.2.1 E-Selektin-Liganden.....	8
2.1.2.2 L-Selektin-Liganden.....	10
2.1.2.3 P-Selektin-Liganden.....	12
2.1.3 Die Adhäsionskaskade der Leukozyten.....	16
2.2 Integrine.....	18
2.2.1 Struktureller Aufbau der Integrine.....	19
2.2.2 Aktivierung der Integrine.....	21
2.2.2.1 Regulierung der Affinität.....	22
2.2.2.2 Regulierung der Avidität.....	23
2.2.3 Very late activation antigen-4 (VLA-4, $\alpha 4\beta 1$).....	25
2.3 Die Immunglobulin-Superfamilie.....	26
2.3.1 Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1).....	27
2.4 Cadherine.....	31
2.5 Die Bedeutung ausgewählter Adhäsionsmoleküle bei dem Prozess der hämatogenen Metastasierung.....	31
2.5.1 Die metastatische Kaskade.....	32
2.5.2 Der Einfluss von Thrombozyten auf die Metastasierung.....	35
2.5.3 Die Beteiligung von E-Selektin.....	37
2.5.4 Die Beteiligung von P-Selektin.....	39
2.5.5 Die Beteiligung von L-Selektin.....	42
2.5.6 Die Beteiligung von VLA-4 und VCAM-1.....	45

2.5.6.1	Möglichkeiten der Beeinflussung von VLA-4 und VCAM-1.....	47
2.6	Strategien der Selektininhibition.....	48
2.7	Der Einfluss von Heparin auf den Verlauf von Krebserkrankungen.....	49
2.7.1	Struktur, Vorkommen und klinischer Einsatz bei onkologischen Patienten.....	49
2.7.2	Die Assoziation von Heparin-gabe und gesenkter Mortalität bei Krebspatienten.....	51
2.7.3	Die Wechselwirkung von Heparin mit L- und P-Selektin.....	54
2.7.4	Die Selektinblockade durch Heparin als Ursache der Metastasierungssenkung.....	55
2.7.5	Selektin-unabhängige Heparineffekte.....	56
2.8	Aufgaben- und Problemstellung.....	58
3	Material und Methoden.....	60
3.1	Verwendete Materialien.....	60
3.1.1	Geräte.....	60
3.1.2	Chemikalien.....	61
3.1.3	Antikörper.....	64
3.1.4	Testsubstanzen.....	65
3.1.5	Sonstiges.....	66
3.2	Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.....	68
3.3	Zellkultur.....	70
3.4	Inkulturnahme von Zellen (Revitalisierung).....	70
3.5	Kryokonservierung von Zellen (Lagerung).....	71
3.6	Bestimmung der Zellzahl mittels CASY®1 Modell TT.....	71
3.7	Zelllinien.....	72
3.7.1	B16F10.....	72
3.7.2	bEnd3.....	73
3.7.3	E-CHO.....	73
3.7.4	HepG2.....	73
3.7.5	HT-29.....	74
3.7.6	NW1539.....	74
3.7.7	U937.....	74
3.8	Thrombozyten.....	75
3.8.1	Vorbereitung der Sepharose®4B-Säule.....	75
3.8.2	Isolierung der Thrombozyten.....	75
3.8.3	Regenerierung der Sepharose®4B-Säule.....	76

3.8.4	Bestimmung der Thrombozytenzahl.....	76
3.8.5	Aktivierung von Thrombozyten.....	78
3.9	Fluoreszenzmarkierungen.....	78
3.9.1	Markierung von Tumorzellen und Thrombozyten mit Calcein.....	78
3.9.2	Markierung von Tumorzellen mit Hoechst 33342.....	79
3.10	Statische Zelladhäsionsassays an P-Selektin.....	80
3.10.1	Testung der Zugänglichkeit von immobilisiertem P-Selektin.....	80
3.10.2	Adhäsion von Zellen an P-Selektin.....	81
3.11	Mikroskopische Untersuchungen zur Zelladhäsion unter physiologischen Flussbedingungen.....	81
3.11.1	Präparation der Modellmembranen.....	81
3.11.1.1	Reinigung der Glasträger.....	81
3.11.1.2	Immobilisierung der Rezeptorproteine (Selektine, VCAM-1).....	82
3.11.1.3	Präparation von planaren sLe ^x -haltigen Bilayern.....	83
3.11.2	Präparation von Endothelzellschichten.....	84
3.11.3	Aufbau der Durchflussapparatur.....	84
3.11.4	Durchführung des Zelladhäsionsassays und Testung potentieller Inhibitoren.....	85
3.11.5	Auswertung mittels Imagoquant MultiTrack-AVI-2.....	87
3.12	Fluoreszenzmikroskopie.....	88
3.12.1	Untersuchung der Interaktion von murinen Melanomzellen mit Thrombozyten in Gegenwart von P-Selektin-Inhibitoren.....	88
3.12.2	Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Heparin an Tumorzellen.....	89
3.13	Durchflusszytometrie.....	90
3.13.1	Prinzip der Methode.....	90
3.13.2	Bindungsfähigkeit von Tumorzellen an P-Selektin.....	91
3.13.3	Bindungsfähigkeit von B16F10 an E-, L- und P-Selektin sowie Untersuchung der Inhibition durch PhyS-4.....	91
3.13.4	PSGL-1 Expression auf Tumorzellen.....	92
3.13.5	P-Selektin-Expression auf Thrombozyten.....	92
3.13.6	Interaktion von Thrombozyten mit Tumorzellen.....	92
3.13.7	VLA-4-Expression auf B16F10.....	93
3.13.8	Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Heparin an Tumorzellen.....	93
3.14	Testsubstanzen.....	94
3.14.1	Fucoidan.....	94
3.14.2	Heparine.....	95
3.14.3	Phycarinsulfate (PhyS).....	96

3.14.4	Curdlansulfate (CurS).....	96
3.14.5	Pullulansulfate (PulS).....	97
3.15	<i>In vivo</i> -Testung von PhyS-4.....	98
3.16	Statistik.....	98
4	Ergebnisse und Diskussion.....	99
4.1	Die Wechselwirkung von Tumorzellen mit P-Selektin.....	99
4.1.1	Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Tumorzellen an P-Selektin unter statischen Bedingungen.....	99
4.1.2	PSGL-1-Expression auf Tumorzellen.....	103
4.1.3	Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Tumorzellen an P-Selektin mittels Durchflusszytometrie.....	104
4.1.4	Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Tumorzellen an P-Selektin unter physiologischen Flussbedingungen.....	107
4.1.5	Wechselwirkung von Tumorzellen mit Thrombozyten.....	109
4.2	Die Inhibition von P-Selektin durch Heparin und semisynthetische sulfatierte Polysaccharide.....	116
4.2.1	Die Inhibition der Zelladhäsion durch Heparine.....	117
4.2.2	Der Einfluss des Sulfatierungsgrades auf die P-Selektin-Inhibition.....	119
4.2.3	Der Einfluss des Molekulargewichtes auf die P-Selektin-Inhibition.....	122
4.2.4	Der Einfluss des Kohlenhydratgrundgerüsts auf die P-Selektin- Inhibition.....	123
4.2.5	Die <i>in vivo</i> -Aktivität eines ausgewählten Phycarinsulfates und Heparins bei P-Selektin-abhängigen Interaktionen.....	125
4.3	Charakterisierung des Phycarinsulfates PhyS-4.....	129
4.3.1	Die <i>in vivo</i> -Aktivität von PhyS-4 im Rahmen der experimentellen Lungenmetastasierung von Melanomzellen.....	129
4.3.2	Weiterführende <i>in vitro</i> -Untersuchungen der Selektininhibition durch PhyS-4.....	130
4.3.2.1	Hemmung der Interaktion von Thrombozyten mit B16F10-Melanomzellen durch Heparine und PhyS-4.....	137
4.4	Untersuchung Selektin-unabhängiger Adhäsionsmechanismen am Beispiel von B16F10-Melanomzellen.....	141
4.4.1	Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens von B16F10 an Endothelzellen unter physiologischen Flussbedingungen.....	141
4.4.2	Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens von B16F10 an VCAM-1 unter physiologischen Flussbedingungen.....	146

4.4.3	Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges durch Heparin.....	149
5	Zusammenfassung.....	156
6	Literaturverzeichnis.....	158
7	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	178
8	Veröffentlichungen.....	180
9	Verfassererklärung.....	182
10	Lebenslauf.....	183

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
ACD-Lösung	Acid-Citrate-Dextrose-Lösung
ADAM-17	a disintegrin and metalloproteinase-17
ADP	Adenosindiphosphat
Aqua dem.	Aqua demineralisata
AT	Antithrombin
ATP	Adenosintriphosphat
B16F10	murine Melanomzelllinie
bEnd3	brain endothelioma cells (murine Endothelzelllinie aus der Hirnrinde)
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CFR	cysteine-rich FGF-receptor
CR-Heparin	Carboxyl-reduziertes Heparin
CRS-Heparin	Carboxyl-reduziertes sulfatiertes Heparin
CS-1	connecting segment-1
CurS	Curdlansulfat
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol
d. h.	das heißt
D-MEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS	degree of sulfation
DSPC	1,2-Distearyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DR3	death receptor-3
E-CHO	Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters, mit E-Selektin transfiziert
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ELAM-1	endothelial leukocyte adhesion molecule-1
entspr.	entsprechend
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ESL-1	E-selectin ligand-1
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	fluorescence activated cell sorting
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FSC	forward scatter

<i>Fut7</i>	Fucosyltransferase-7
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalaktosamin
ggf.	gegebenenfalls
Gl.	Gleichung
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GLG	Golgi complex-localized glycoprotein
GlyCAM-1	glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1
GMP-140	granule membrane protein-140
GP	Glykoprotein
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEC	high endothelial cell
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-piperazin- <i>N'</i> -2-ethanolsulfonsäure
HepG2	humane Leberkarzinomzelllinie
HEV	high endothelial venule
hP-Sel	humanes P-Selektin
HSA	heat stable antigen
HT-29	humane Kolonkarzinomzelllinie
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
ICAM	intercellular adhesion molecule
I. E.	Internationale Einheiten
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
Ig-SF	Immunglobulin-Superfamilie
IL	Interleukin
INCAM-110	inducible cell adhesion molecule-110
INR	international normalized ratio
i. v.	intravenös
K_D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
K_{off}	Dissoziationskonstante
K_{on}	Assoziationskonstante
LDL	low density lipoprotein
LD-Objektiv	long distance-Objektiv
LECAM	lectin cell adhesion molecule
LFA-1	lymphocyte function associated antigen-1
LMWH	low molecular weight heparin
M.	Morbus
Mac-1	β 2-Integrin
MadCAM-1	mucosal addressin cell adhesion molecule-1
MEM	minimum essential medium
mE-Sel	murines E-Selektin
MHC	major histocompatibility complex
MIA	melanoma inhibitory activity
MIDAS	metal ion-dependent adhesion site
mL-Sel	murines L-Selektin
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMWH	medium molecular weight heparin
mP-Sel	murines P-Selektin
mRNA	messenger ribonucleic acid
MW	molecular weight

MW _{HD}	molecular weight (charakterisiert durch das hydrodynamische Volumen)
N-CAM	neural cell adhesion molecule
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
n. s.	nicht signifikant
NW1539	humane Melanomzelllinie
o. g.	oben genannt
OSGP	O-Sialoglykoprotease
PADGEM	platelet activation-dependent granule external membrane protein
PAF	Plättchen-aggregierender Faktor
PAR-1	protease activated receptor-1
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate-buffered saline
PECAM-1	platelet/endothelial cell adhesion molecule-1
PhyS	Phycarinsulfat
PNA _d	peripheral lymph node addressin
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
PulS	Pullulansulfat
QCM	quartz crystal microbalance
RO-Heparin	reduced oxyheparin
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s. c.	subkutan
SCR	short consensus repeat
sLe ^a	sialyl Lewis ^a
sLe ^x	sialyl Lewis ^x
SSC	side scatter
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TACE	tumor necrosis factor- α -converting enzyme
TCIPA	tumor cell-induced platelet activation
TF	tissue factor
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TRAP-14	thrombin receptor agonist peptide-14
TXA ₂	Thromboxan A ₂
U937	humane Zelllinie eines diffusen histiozytischen Lymphoms
u. a.	unter anderem
UFH	unfraktioniertes Heparin
u. U.	unter Umständen

VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLA-4	very late activation antigen-4
VLMWH	very low molecular weight heparin
vs.	versus
VTE	venöse Thromboembolie
vWF	von-Willebrand-Faktor
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Abkürzungen für Aminosäuren

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
Glu	E	Glutaminsäure
Gln	Q	Glutamin
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

Die in der Arbeit verwendeten Einheiten entsprechen dem internationalen Einheitensystem.

1 Einleitung

Das Auftreten einer Metastasierung im Verlauf einer Krebserkrankung stellt die häufigste Todesursache für die meisten Patienten dar. Komplexe und zahlreiche Mechanismen vermitteln die Invasion von Zellen des Primärtumors in das Blutgefäßsystem, Überleben und Arrest der Zellen im Blutstrom sowie das fortschreitende Wachstum an entfernten Regionen des Organismus. Das Verständnis dieser Abläufe und ihrer dynamischen Interaktionen kann dazu beitragen, molekulare Zielstrukturen zu identifizieren und für eine mögliche Therapie zu nutzen.

Selektine, eine Familie Kohlenhydrat-bindender Zelloberflächenmoleküle, initiieren die Leukozytenrekretierung während der Immunantwort und bei inflammatorischen Prozessen. Darüber hinaus binden sie an eine Vielzahl von Tumorzellen mit geeigneter Ligandenausstattung und fördern über verschiedene Mechanismen die hämatogene Metastasierung. Neben Selektinen sind Integrine und Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie maßgeblich bei adhäsiven Interaktionen zwischen Krebszellen und dem Gefäßendothel beteiligt. Aus diesem Grund werden zahlreiche Anstrengungen unternommen, deren Wechselwirkung mit malignen Tumorzellen zu beeinflussen.

Interessanterweise verbessert die Administration von Heparin im Rahmen der Thromboseprophylaxe und -therapie die Überlebensrate von Krebspatienten, wobei die antikoagulatorische Aktivität diesen Effekt nur zum Teil erklären kann. Die Identifizierung der dafür verantwortlichen Heparinwirkungen stellt ein aktuelles Forschungsthema dar.

Die vorliegende Arbeit veranschaulicht das Adhäsionsverhalten von Zellen unterschiedlicher Tumorentitäten *in vitro* und ermöglicht Einblicke in die Mechanistik der Metastasierung. Darüber hinaus steht Heparin im Fokus der Untersuchungen, um dessen positiven Auswirkungen auf den Verlauf von Krebserkrankungen auf molekularer Ebene demonstrieren zu können. Es wird gezeigt, dass die kombinierte Wirkung unterschiedlicher Adhäsionsmoleküle kritische Bindungsereignisse der Tumorzellen kontrolliert, wobei Heparin an mehreren Schritten inhibitorisch eingreifen kann, womit es strukturell verwandten Substanzen weit überlegen ist.

2 Theoretischer Teil

2.1 Selektine und Liganden

2.1.1 Struktureller Aufbau und Expression der Selektine

Selektine zählen zur Klasse der Lektine, die Proteine mit speziellen Bindungsstellen für spezifische zelloberflächliche Kohlenhydratmuster darstellen. Dabei verändern sie nach der Bindung die Zuckerstrukturen nicht und sind von Antikörpern und Enzymen abzugrenzen. Die drei Mitglieder der Selektinfamilie, nach ihrer zellulären Lokalisation als E (Endothel)-, L (Leukozyten)- und P (Plättchen und Endothel)-Selektin bezeichnet, werden aufgrund ihrer Ca^{2+} -abhängigen Bindung den C-Typ-Lektinen zugeordnet. Sie wurden 1989 erstmalig als „lectin cell adhesion molecules“ (LECAMs) beschrieben und vermitteln, wie der Name bezeichnet, die selektive Bindung an ihre Liganden über eine aminoterminal Lektindomäne, die aus etwa 120 Aminosäuren aufgebaut ist und innerhalb der drei Selektine eine ca. 65%ige Sequenzhomologie aufweist¹.

Der Aufbau der Selektine folgt einem allgemeinen Schema (Abb. 2-1). An die Lektindomäne schließt sich eine dem „epidermal growth factor“ (EGF) ähnliche Region an, die aus 35 bis 40 Aminosäuren besteht und einen modulierenden Effekt auf den Kohlenhydratbindenden Bereich ausübt². Der Einfluss der EGF-ähnlichen Region auf die durch die Lektindomäne vermittelte Ligandbindung liegt dabei in der Aufrechterhaltung einer bestimmten Konformation, die in einer hohen Bindungsaffinität resultiert³. Es folgt eine variable Anzahl sogenannter „short consensus repeats“ (SCRs). Sie übernehmen den entscheidenden Anteil der räumlichen Ausdehnung des Rezeptors auf der Zelloberfläche, wobei deren Anzahl ein Unterscheidungskriterium zwischen den Selektintypen darstellt. Die funktionelle Bedeutung dieser sich wiederholenden, aus ca. 60 Aminosäuren bestehenden Einheiten ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Man vermutet durch die Ausdehnung ein Exponieren der Lektindomäne, was eine verbesserte Interaktion zur Folge hat⁴. Über die transmembranäre Region sind die Selektine in der Zellmembran verankert. Darauf folgt ein C-terminaler zytoplasmatischer Rest, der verglichen mit dem Gesamtmolekül einen sehr kleinen Teil einnimmt und aufgrund seiner Verbindung mit dem Zytoskelett Funktionen bei der Signaltransduktion innerhalb der Zelle übernimmt⁵⁻⁷.

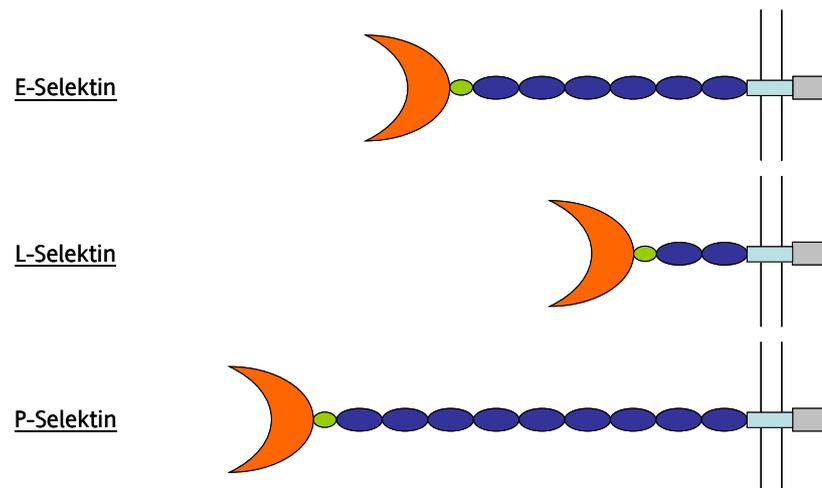


Abb. 2-1: Aufbau der humanen Selektine. Die einzelnen Domänen sind folgendermaßen dargestellt: *orange* N-terminale Lektindomäne, *grün* EGF-ähnliche Region, *dunkelblau* „short consensus repeats“, *hellblau* transmembranäre Domäne, *grau* C-terminaler zytoplasmatischer Rest. (modifiziert nach Bevilacqua & Nelson⁸)

Die essentielle physiologische Bedeutung der Selektine liegt in der initialen Kontaktaufnahme zwischen Leukozyten und Endothelzellen begründet. Als Folge dieser Wechselwirkung werden die weißen Blutzellen in charakteristische Rollbewegungen entlang des Endothels versetzt, was eine Voraussetzung für die nachfolgende Integrin-vermittelte Adhäsion und Extravasation darstellt. Auf die Adhäsionskaskade der Leukozyten im Entzündungsprozess wird in Kapitel 2.1.3 näher eingegangen.

Interaktionen mit Selektinen sind jedoch nicht nur auf Leukozyten begrenzt, sondern darüber hinaus bei einer Vielzahl von Tumorzellen^a anzutreffen. Durch vielfältige Selektin-vermittelte Bindungsmöglichkeiten der Zellen an das Gefäßsystem und an Blutbestandteile des Organismus sind diese Adhäsionsmoleküle maßgeblich an der Metastasierung von Krebszellen beteiligt. Der Einfluss der Selektine auf die Dissemination von Tumorzellen stellt einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit dar und wird ausführlich in Kapitel 2.5 beschrieben.

In den folgenden Abschnitten werden die drei Mitglieder der Selektinfamilie zunächst charakterisiert.

^a In dieser Arbeit sind mit dem Begriff „Tumorzellen“ stets Zellen maligner Tumore gemeint.

2.1.1.1 E-Selektin

E-Selektin (CD62E, ELAM-1) erscheint auf der Oberfläche von Endothelzellen nach Aktivierung mit Zytokinen wie IL-1 und TNF- α oder mit Lipopolysacchariden. Erst nach drei bis vier Stunden kommt es zur maximalen Konzentration von E-Selektin⁹, da das Glykoprotein durch *de novo*-Synthese gebildet wird. Nach 24 Stunden erreicht die Konzentration wieder ihren Ausgangswert¹⁰. Dabei wird das Selektin durch Endozytose von der Zelloberfläche entfernt und in Lysosomen abgebaut. Die Expression von E-Selektin wird durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B gesteuert¹¹. Dieser wird durch freie Sauerstoffradikale, die normalerweise durch eine Reihe von Radikalfängern gegenreguliert werden, aktiviert¹². Demzufolge wird durch oxidativen Stress in der Zelle als eine Folge vermehrt E-Selektin exprimiert.

Die Lektindomäne des E-Selektins weist eine globuläre Struktur mit einer flachen Bindungstasche für den Kohlenhydratliganden auf, was anhand röntgenographischer Untersuchungen festgestellt werden konnte¹³. E-Selektin enthält bei Mensch, Maus und Hund sechs SCRs; bei anderen Organismen findet sich eine abweichende Anzahl, so sind es bei Ratte und Kaninchen beispielsweise nur fünf¹⁴.

2.1.1.2 L-Selektin

L-Selektin (CD62L, LECAM-1, gp90^{MEL-14}) ist konstitutiv auf fast allen Leukozyten-Subtypen vorhanden, besitzt bei allen Spezies nur zwei SCRs und ist somit der kleinste Vertreter der Selektinfamilie. Es ist auf den Spitzen der Mikrovilli lokalisiert, wodurch trotz der relativ geringen räumlichen Ausdehnung des Moleküls eine gute Zugänglichkeit der Liganden möglich ist^{15,16}.

L-Selektin, zunächst als gp90^{MEL-14} bezeichnet, da es mittels des monoklonalen Antikörpers MEL-14 detektiert wurde, spielt sowohl bei den Leukozytenrollen eine entscheidende Rolle als auch beim „homing“ von Lymphozyten in die peripheren Lymphknoten. Über das Selektin, den „homing receptor“, gelangen die Lymphozyten an den „high endothelial venules“ (s. Kapitel 2.1.2.2) in das Lymphsystem¹⁷. Nach Aktivierung der Leukozyten wird L-Selektin rasch von der Oberfläche durch Proteolyse abgespalten, was als „shedding“ bezeichnet wird. Dieses L-Selektin-Shedding scheint auf das Rollverhalten der Leukozyten einen Einfluss zu haben, wie Hafezi-Moghadam & Ley zeigen konnten. Demnach senkt dessen Unterdrückung die Rollgeschwindigkeit und führt zu festen Adhäsionen. So-

mit stellt der Prozess der proteolytischen L-Selektin-Spaltung eine Voraussetzung für das „rolling“ von Leukozyten dar¹⁸.

2.1.1.3 P-Selektin

P-Selektin (CD62P, PADGEM, GMP-140) wird in funktionsfähiger Form konstitutiv synthetisiert und in den sekretorischen α -Granula von Thrombozyten und den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen gespeichert. Nach Aktivierung mit Thrombin, Histamin oder Phorbolmyristat wird das intrazellulär gespeicherte P-Selektin innerhalb von zehn Minuten zur Oberfläche gebracht¹⁹. Neben dieser raschen Exposition von P-Selektin findet eine Synthese auf Transkriptionsebene nach Stimulierung mit Zytokinen oder Lipopolysacchariden statt²⁰. In einem Zeitraum von 30 bis 60 Minuten nach Präsentation auf der Zelloberfläche wird P-Selektin durch Endozytose erneut in die Zelle aufgenommen, wo entweder ein Abbau im Lysosom oder eine Akkumulation in den Speichergranula erfolgt²¹. P-Selektin stellt das längste Selektin dar; es enthält beim Menschen neun SCRs, bei Maus, Ratte und Schaf sind acht dieser Elemente zu finden¹⁴.

2.1.2 Selektinliganden

Als einzige Gruppe von Adhäsionsmolekülen treten Selektine mit ihren Bindungspartnern über die Erkennung von Kohlenhydratstrukturen in Wechselwirkung. Es wurden bislang nur einzelne hochaffine Liganden charakterisiert. Grundsätzlich handelt es sich dabei um mucinähnliche Glykoproteine. Als Mucine bezeichnet man hydrophile, langgestreckte Glykoproteine, die über eine Vielzahl von Seitenketten verfügen. Die Zuckerrreste, hauptsächlich von Bedeutung sind fucosylierte Laktosaminoglykane, sind meist über O-glykosidische Bindungen an Serin oder Threonin des Peptidgerüsts geknüpft und stellen die eigentlichen Bindungsepitope dar. Der Anteil der Kohlenhydrate ist sehr hoch und kann bei einzelnen Mucinen 75% betragen.

Bereits vor der strukturellen Aufklärung physiologischer Selektinliganden stellte man fest, dass alle Selektine eine gewisse Affinität zu der Blutgruppenderminante Lewis^x zeigen, die jedoch gegenüber deren Sialinsäurederivat sialyl Lewis^x (sLe^x) erhöht ist²².

Die Verknüpfung von *N*-Acetyllaktosamin mit Fucose und Sialinsäure in der Form Neu5Aca2,3Gal β 1,4[Fuca α 1,3]GlcNAc-O-R ist charakteristisch für sLe^x. An der Interaktion

von sLe^X mit Selektinen sind vor allem die Carboxylgruppe der Sialinsäure, die Hydroxylgruppen der Fucose in 2-, 3- und 4-Stellung sowie die Hydroxylgruppe der Galaktose in Position 6 beteiligt²³ (Abb. 2-2).

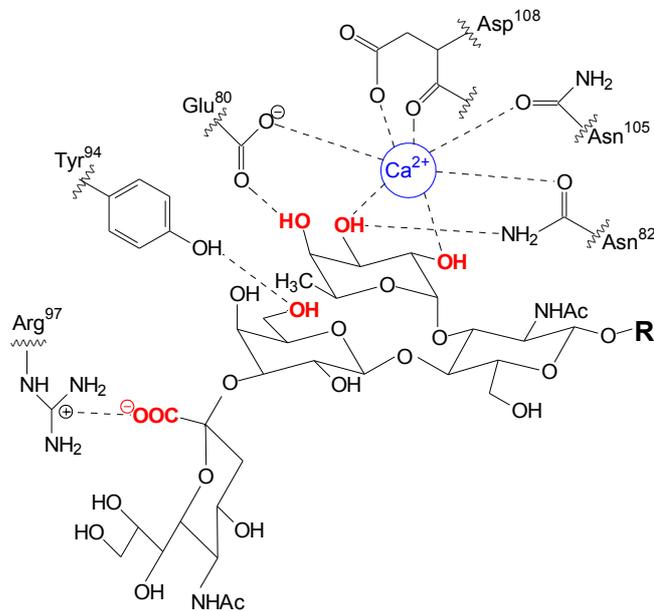


Abb. 2-2: Sialyl Lewis^X. Die rot markierten funktionellen Gruppen des Tetrasaccharids bestehend aus Fucose, Galaktose, *N*-Acetylglucosamin und Sialinsäure sind essentiell für die Selektinbindung, die Ca^{2+} -abhängig verläuft.

Das Positionsisomer sLe^a ($Neu5Ac\alpha 2,3Gal\beta 1,3[Fuca1,4]GlcNAc-O-R$) weist zu allen drei Selektinen die gleiche Bindungsaffinität auf^{24,25}. Trotz der vergleichsweise sehr geringen Affinität der Selektine zu diesen Epitopen – der K_D -Wert für die Wechselwirkung eines einzelnen sLe^X -Moleküls mit E-Selektin beträgt 0,5-1,0 mM^{23,26} – konnten bislang keine besser bindenden Kohlenhydrate gefunden werden.

Lektindomänen erkennen typischerweise spezifische Oligosaccharide mit beachtenswerter Selektivität, aber relativ geringer Affinität, die durch multiple Bindungsstellen innerhalb eines einzigen Lektinmoleküls oder durch molekulare Aggregation eines monovalenten Lektins auf der Zelloberfläche erhöht werden kann²⁷.

Im Gegensatz zu der im millimolaren Bereich liegenden Affinität von sLe^X zu Selektinen zeigen natürlich vorkommende Mucinliganden K_D -Werte nanomolarer Größenordnung^{28,29}. Daher scheinen Selektine in ähnlicher Weise in der Lage zu sein, hochaffine Bindungen zu schaffen.

Eine multivalente Anordnung von Bindungsepitopen erklärt teilweise die hohen Affinitäten natürlicher Liganden. Eine derartige Clusterung kann hierbei auf Seite der Selektine

und/oder auf der Seite der Liganden liegen. Mehrere Studien demonstrieren deren Bedeutung für Selektin-Ligand-Interaktionen. Die Clusterung von E-Selektin-Molekülen in der Umgebung von Leukozyt-Endothelzell-Bindungen konnte mittels konfokaler Mikroskopie sichtbar gemacht werden⁷. E-Selektin ist in sogenannten Lipidrafts auf der Zelloberfläche lokalisiert, was für eine Signalweiterleitung während der Leukozyt-Endothelzell-Interaktion nötig ist^{30,31}. Auch für L- und P-Selektin konnten Beweise für das Vorliegen in Clustern auf der Zelloberfläche erbracht werden^{32,33}. Glykolipide mit sLe^x-Strukturen können E-Selektin-abhängiges Zellrollen vermitteln, wenn sie in lateralen Clustern in einer Modellmembran präsentiert werden³⁴. Daneben ist CD24, ein Ligand für P-Selektin, ebenfalls in Rafts organisiert³⁵.

Neben der Multivalenz von Bindungen ist eine ausreichende Flexibilität der einzelnen Epitope erforderlich, um physiologische Funktionen zu erfüllen, wie anhand der Wechselwirkung von E-CHO-Zellen mit sLe^x-haltigen Glykolipiden ermittelt werden konnte³⁶⁻³⁸.

Die Bemühungen, Selektinliganden zu identifizieren und neue Erkenntnisse über deren Funktionen zu gewinnen, sind groß. Allerdings sei an dieser Stelle zu erwähnen, dass unterschieden werden muss zwischen Molekülen, die mit rekombinanten Selektinen *in vitro* interagieren können, und denjenigen Strukturen, die *in vivo* an ein Zelloberflächen-Selektin in biologisch relevanter Art und Weise binden. Die Kriterien für einen wirklichen Selektinliganden sind bei Varki³⁹ zusammengefasst und im folgenden aufgeführt:

1. Der Ligand sollte am richtigen Ort, zur richtigen Zeit präsent sein. Beispielsweise muss ein P-Selektin-Ligand auf der Oberfläche reifer, zirkulierender Blutzellen zu einem Zeitpunkt erscheinen, an dem P-Selektin auf der Oberfläche von Endothelzellen oder Thrombozyten exprimiert wird.
2. Die selektive Entfernung oder Blockade des vermeintlichen Liganden auf der intakten Zelle sollte biologisch relevante Interaktionen verhindern.
3. Die Abwesenheit des Liganden sollte die Funktion des relevanten Selektins in der spezifischen Situation aufheben.
4. Der Ligand sollte mit gewisser Selektivität durch das in Frage kommende Selektin mit relativ hoher Affinität und vorzugsweise mit gut definierter Stöchiometrie erkannt werden.

Einige dieser Voraussetzungen können nicht vollständig erfüllt werden, wenn andere relevante Liganden gleiche Funktionen teilen und/oder die Erkennung durch andere Selektine überlappt. Auf Liganden, die den Großteil der o. g. Eigenschaften aufweisen, soll im folgenden ausführlicher eingegangen werden.

2.1.2.1 E-Selektin-Liganden

Der „E-selectin ligand-1“ (ESL-1) wurde Anfang der 90er Jahre als ein fucosyliertes, membranständiges, etwa 150 kD schweres Glykoprotein beschrieben, das auf Maus-Neutrophilen und myeloiden Zellen vorkommt. Im Gegensatz zu den meisten anderen Selektinliganden sind die Kohlenhydratepitope *N*-glykosidisch gebunden⁴⁰. Desweiteren stellte sich heraus, dass ESL-1 homolog zu dem „basic fibroblast growth factor“ (bFGF)-bindenden Protein „cysteine-rich FGF receptor“ (CFR)^{41,42} und identisch mit dem „Golgi complex-localized glycoprotein-1“ (GLG1), auch als MG-160 bezeichnet, ist⁴³.

Ein Vorkommen im Inneren der Zelle würde eine Funktion des GLG1 als Selektinligand verhindern, es wäre demnach nicht „am richtigen Ort, zur richtigen Zeit“ vorhanden. GLG1 muss also auf der Oberfläche der Zellmembran exprimiert werden und spezifische post-translationalen Modifikationen erfahren. Paradoxe Weise zeigten Studien von CFR und MG-160 in transfizierten CHO-Zellen, primären neuronalen und anderen Zellen eine Lokalisation von GLG1 hauptsächlich im Golgi-Apparat und nicht auf der Zelloberfläche^{43,44}.

Ahn et al. konnten 2005 eine neuartige Isoform von GLG1, benannt als GLG2, identifizieren. Dieses Protein gleicht im Aufbau dem GLG1, unterscheidet sich jedoch durch eine zusätzliche, 24 Aminosäuren umfassende Erweiterung im Bereich der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne. Sie klärten auf, dass GLG1 und GLG2 Produkte eines Gens sind. Durch alternatives Spleißen der mRNA resultiert ein Protein mit einem längeren zytoplasmatischen Rest (37 Aminosäuren, GLG2), der allein ausreicht, um die Expression zum Golgi-Apparat zu richten, wogegen die ungespleißte Variante zu einem Produkt mit kürzerer zytoplasmatischer Domäne (13 Aminosäuren, GLG1) führt, welches auch auf Zelloberflächen nachgewiesen werden kann⁴⁵. Die Mechanismen, die zu einer Verlagerung des Proteins GLG1 vom Golgi-Apparat zur Zelloberfläche führen, sind nicht eindeutig geklärt. Die zytoplasmatische Domäne allein scheint den Expressionsort nicht zu kontrollieren. Gonatas et al. zeigten mittels Mutagenese-Studien, dass die Deletion von einer bis neun Aminosäuren im C-Terminus mit einer geringen Menge zelloberflächlicher Expression assoziiert ist⁴⁶. Selbst bei fast vollständigem Fehlen der zytoplasmatischen Domäne wird GLG1 hauptsächlich im Golgi-Apparat exprimiert. Möglicherweise spielen Mechanismen

wie Proteolyse oder Fucosylierung für das Vorkommen der Endprodukte eine Rolle. Im Fall des GLG1 als E-Selektin-Ligand ist anzunehmen, dass eine regulierte Fucosylierung der luminalen Domäne von GLG1 zu einem Verlust der Affinität zum entscheidenden luminalen Golgi-Protein und einer Erhöhung der Affinität zu E-Selektin führt. Eine Studie, die diese Hypothese unterstützt, ist die Detektion einer CFR-1-Variante auf der Oberfläche verschiedener Krebszellen. Interessanterweise wurde mRNA für GLG in gesundem und malignem Gewebe gefunden, wogegen ein positives Staining auf der Zelloberfläche nur bei den malignen Zellen beobachtet werden konnte. Daher wurde vermutet, dass die spezifisch glykosylierte Variante nur auf der Zelloberfläche vorkommt⁴⁷. Dimitroff et al. untersuchten eine humane Prostatakarzinomzelllinie im Vergleich zu gesundem Prostatagewebe hinsichtlich der Selektinligandexpression. Sie konnten ESL-1 in allen Geweben in intrazellulären Strukturen nachweisen. Demzufolge stellt ESL-1 bei den untersuchten Zellen keinen funktionsfähigen E-Selektin-Liganden dar⁴⁸.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ESL-1 nur dann als Ligand für E-Selektin agiert, wenn er auf der Zelloberfläche exprimiert wird und korrekt glykosyliert ist. Sind diese Bedingungen erfüllt, erfolgt die Bindung mit hoher Affinität an E-Selektin, während L- und P-Selektin nicht gebunden werden⁴⁹. Im Gegensatz zu L-Selektin und PSGL-1, die auf den Spitzen der Mikrovilli von Leukozyten exprimiert werden und durch diese exponierte Lage das „tethering“ und „rolling“ dieser Zellen initiieren (s. Kapitel 2.1.3), findet sich ESL-1 im Randbereich der Mikrovilli⁵⁰, was auf eine spätere Funktion des E-Selektins im Rollprozess der Leukozyten hinweist.

Der ursprünglich als P-Selektin-Ligand beschriebene „P-selectin glycoprotein ligand-1“ (PSGL-1) weist gegenüber E-Selektin ebenfalls eine gewisse Affinität auf. In Kapitel 2.1.2.3 wird ausführlich darauf eingegangen.

An dieser Stelle soll kurz der „death receptor-3“ (DR3) vorgestellt werden, der kürzlich als neuer Bindungspartner für E-Selektin beschrieben wurde. DR3 wird auf den Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und LoVo exprimiert und durch E-Selektin aktiviert, was wiederum zu einer Aktivierung von p38 und ERK mit resultierender transendothelialer Migration und Überlebensvorteil der Zellen führt. Interessanterweise agiert DR3 hierbei nicht als „death receptor“ im Sinne der Apoptoseeinleitung, sondern erfüllt bis dahin unbekannt Funktionen⁵¹.

2.1.2.2 L-Selektin-Liganden

L-Selektin bindet an sulfatierte sLe^x-Epitope auf O-Glykanen verschiedener Glykoproteine in „high endothelial venules“ (HEVs)⁴.

HEVs sind spezialisierte postkapillare Venolen aller sekundärer lymphatischen Organe (mit Ausnahme der Milz) einschließlich Lymphknoten, Rachenmandeln, Peyerscher Plaques in Dünndarm und Wurmfortsatz sowie kleiner Aggregate lymphatischen Gewebes in Magen und Dickdarm⁵². Sie ermöglichen dort den Lymphozyten die Diapedese aus dem Blut in das Lymphsystem. Das Endothel einer HEV besteht im Unterschied zu anderen Venolen nicht aus flachen, sondern aus kubisch geformten Zellen („high endothelial cells“, HECs), die der Venole ein dickeres Endothel verleihen und namensgebend sind. Die Gefäßwände von HEVs enthalten eine große Anzahl von Lymphozyten unterschiedlicher Extravasationsstadien, was ihre Aufgabe in der Lymphozytenrezirkulation verdeutlicht⁵³. An dieser Stelle sei kurz darauf hingewiesen, dass neben dem Vorkommen in lymphatischen Geweben Gefäße mit HEV-typischer Erscheinung und entsprechender Ligandausstattung auch bei chronisch-inflammatorischen Zuständen wie rheumatoider Arthritis, M. Crohn, Colitis ulcerosa oder Hashimoto-Thyreoiditis auftreten können⁵².

Die ersten auf HEVs exprimierte L-Selektin-Liganden, die identifiziert wurden, waren das „glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1“ (GlyCAM-1), CD34 und Podocalyxin. Wie viele andere Selektinliganden zählen sie zu Sialomucinen.

Während CD34 und Podocalyxin membranständige Proteine sind, wird GlyCAM-1 sezerniert und erreicht hohe Plasmalevel^{54,55}. Es wurde in murinen HEVs nachgewiesen und stellt den am besten charakterisierten L-Selektin-Liganden dar. Seine fehlende Membranverankerung spricht gegen eine Funktion bei der Lymphozytenrezirkulation, jedoch wird es als Regulator der Integrinaktivierung bei diesem Prozess diskutiert⁵⁶. GlyCAM-1 weist Sulfatierungen am sLe^x auf, die an zwei unterschiedlichen Positionen auftreten können. Bei einer Sulfatierung am C-6 des GlcNAc spricht man von 6-sulfo-sLe^x, bei der Sulfatierung an C-6 der Galaktose wird die Struktur als 6'-sulfo-sLe^x bezeichnet^{57,58}. Eine verstärkte Interaktion von 6-sulfo-sLe^x mit L-Selektin gegenüber dem unsulfatierten sLe^x gilt als gesichert, wogegen die Frage der physiologischen Relevanz von 6'-sulfo-sLe^x nicht eindeutig geklärt ist, lassen sich doch in humanen Lymphknoten und Rachenmandeln im Gegensatz zu murinem GlyCAM-1 keine detektierbaren 6'-sulfo-sLe^x-Level ermitteln^{58,59}.

CD34 und Podocalyxin werden sowohl auf vaskulärem Endothel als auch auf hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert. Ihre L-Selektin-reaktiven Formen sind in humanen HEVs der Rachenmandeln anzutreffen, wogegen nicht-reaktive Formen in nicht-entzündeten Gefäßen gefunden werden^{60,61}.

Die zweite Herangehensweise, um HEV-ständige L-Selektin-Liganden zu ermitteln, wurde unter Einsatz des monoklonalen Antikörpers MECA-79⁶² durchgeführt, der Lymphknoten-HEVs in Mäusen markiert, Lymphozytenadhäsion an HEVs *in vitro* blockiert und das „homing“ in Lymphknoten inhibiert. Glykoproteine in HEVs, die mit MECA-79 reagieren, werden als „peripheral lymph node addressin“ (PNAd) zusammengefasst. In murinen Lymphknoten und humanen Rachenmandeln sind mindestens vier Mitglieder dieses Komplexes zu finden. Im Jahr 2002 wurde neben GlyCAM-1 (murin), CD34 (human und murin) und Podocalyxin (human) Endomucin, ein weiteres membranäres Sialomucin, als Mitglied dieser Gruppe identifiziert, welches sowohl murinen als auch humanen Ursprungs ist⁶³.

Das „mucosal addressin cell adhesion molecule-1“ (MadCAM-1), exprimiert in mesenterialen Lymphknoten und auf HEVs in Peyerschen Plaques, stellt ebenfalls eine PNAd-Komponente mit einer kurzen Mucindomäne dar⁶⁴. MadCAM-1 weist neben dieser Kohlenhydratstruktur auch Immunglobulin-Domänen im Molekül auf, wodurch es zusätzlich als Ligand für das Lymphozyten-Integrin $\alpha 4\beta 7$ im „homing“ der Lymphozyten in Darm-assoziierten lymphoiden Organen und Geweben fungieren kann⁶⁵.

Andere Mitglieder des PNAd-Komplexes wurden noch nicht molekular identifiziert, obwohl bereits bekannt ist, dass sie sensitiv gegenüber dem Mucin-degradierenden Enzym O-Sialoglykoprotease (OSGP) sind⁶¹.

Weiterhin soll festgehalten werden, dass humane tonsilläre HEVs L-Selektin-Liganden exprimieren, die unempfindlich gegenüber OSGP sind und keine MECA-79-Reaktivität aufweisen⁶⁶.

Die Bindungsfähigkeit von PSGL-1 an L-Selektin wird in Kapitel 2.1.2.3 näher beschrieben.

Nucleolin stellt ein multifunktionales Kernprotein schnell wachsender eukaryotischer Zellen dar, welches darüber hinaus mit einer zelloberflächlichen Expression in Verbindung gebracht wurde. Es wurde angenommen, dass es ständig zwischen Zellkern und -plasma wechselt⁶⁷. In den 90er Jahren wurde Nucleolin auf der Oberfläche bestimmter Leberzelllinien nachgewiesen, was jedoch nicht mit einer L-Selektin-Bindung in Zusammenhang gebracht wurde^{68,69}. Vielmehr beschrieben die Autoren Nucleolin als ein LDL-bindendes Protein⁶⁸.

Interessanterweise wurde Nucleolin im Jahr 2001 als ein weiterer L-Selektin-Ligand auf humanen Leukozyten und hämatopoetischen Progenitorzellen beschrieben⁷⁰, nachdem 1994 der erste Beweis für das Vorkommen eines L-Selektin-Liganden auf nicht-endotheli-

alen Zellen erbracht wurde, der später als eine Glykoform von CD44 identifiziert werden konnte^{71,72}. Inwieweit eine biologische Relevanz von zelloberflächlichem Nucleolin hinsichtlich einer Interaktion mit L-Selektin vorliegt, bleibt zu klären. Es könnte neben PSGL-1 (s. Kapitel 2.1.2.3) homotypische interzelluläre Wechselwirkungen zwischen fließenden und bereits endothelial gebundenen Leukozyten vermitteln, wodurch eine Beschleunigung der Leukozytenrekrutierung in entzündetes Gewebe angenommen wird^{73,74}.

Neben der ursprünglich beschriebenen Bedeutung von L-Selektin-Liganden im Prozess des „homing“ von Lymphozyten und der Rekrutierung von Leukozyten bei akuten und chronischen Entzündungszuständen wurden weitere Funktionen deutlich, die die hämatogene Metastasierung von Krebszellen, Mechanismen bei der entzündlichen Demyelinisierung von Axonen und die Einnistung des frühen menschlichen Embryos in die Gebärmutter umfassen⁷⁵.

2.1.2.3 P-Selektin-Liganden

Erstmals im Jahr 1992 von Moore et al. beschrieben, stellt PSGL-1 den am besten charakterisierten Selektinliganden dar. Es handelt sich dabei um ein langgestrecktes, über Disulfidbrücken verbundenes Homodimer mit einem Molekulargewicht von etwa 250 kD⁷⁶. PSGL-1 wird von den meisten Leukozyten exprimiert, wobei festgehalten werden soll, dass seine Anwesenheit auf einem bestimmten Zelltyp nicht zwangsläufig seine funktionelle Relevanz indiziert. Beispielsweise exprimieren die meisten Lymphozyten PSGL-1, aber nur 10-20% sind tatsächlich in der Lage, P-Selektin zu binden⁷⁷. Für die Interaktion muss das Protein durch Glykosylierung und Tyrosinsulfatierung posttranslational modifiziert werden⁴.

Der Ligand ist auf den Spitzen der Mikrovilli lokalisiert und kann durch Interaktionen mit dem ebenfalls sehr langgestreckten P-Selektin das „rolling“ der Leukozyten initiieren. PSGL-1 enthält neben α -1,3-Fucosylierungen α -2,3-verknüpfte Sialinsäure und das sLe^X-Motiv, wobei die Kohlenhydrate O-glykosidisch an Threonin-57 gebunden sind. Deren Anteil macht jedoch nur einen geringen Teil des gesamten Sialinsäure- bzw. sLe^X-Gehalts auf der Zellmembran aus⁷⁸. Dies widerspricht der Annahme, dass viele schwachaffine Einzelbindungen für die hohe Affinität des natürlichen Liganden verantwortlich sind. In späteren Studien wurde deutlich, dass in PSGL-1 verzweigte Kohlenhydratseitenketten vorherrschen. Die als „core-2 structures“ bezeichneten β -1,6-Verknüpfungen von GalNAc mit GlcNAc resultieren in einer erhöhten räumlichen Nähe der Bindungsepitope, was die Affi-

nitätssteigerung erklären könnte⁷⁹. Zusätzlich zu diesen Kohlenhydrateigenschaften besitzt PSGL-1 drei N-terminale sulfatierte Tyrosinreste an Position 46, 48 und 51, die eine deutliche Affinitätserhöhung zu P-Selektin bewirken, wobei die Sulfatierung eines Tyrosinrestes essentiell ist^{80,81}.

Darüber hinaus stellt PSGL-1 einen wichtigen Liganden für L-Selektin dar⁸², wobei dieselben strukturellen Voraussetzungen nötig sind. Durch diese Interaktion werden homotypische Leukozyt-Leukozyt-Interaktionen vermittelt, was, wie oben erwähnt, zu einer Beschleunigung des Rekrutierungsprozesses führt.

E-Selektin wird ebenfalls von PSGL-1 gebunden, jedoch mit etwa 50fach geringerer Affinität⁸³. Bei der Interaktion sind ebenfalls „core-2“-O-Glykane an Position Threonin-57 beteiligt, wogegen sulfatierte Tyrosinreste nicht essentiell sind⁸⁴. Allerdings konnten Martinez et al. 2005 zeigen, dass E-Selektin-vermitteltes Zellrollen entlang eines PSGL-1-Substrats nur teilweise von „core-2“-O-Glykanen abhängig ist. Zusätzliche Bindungsstellen unterstützen mehr als 75% des E-Selektin-vermittelten Zellrollens⁸⁵. Die Bindungsfähigkeit an E-Selektin konnte desweiteren mit einer *in vivo*-Studie belegt werden, die verdeutlicht, dass PSGL-1 auf T1-Helferzellen als E-Selektin-Ligand agiert, indem er deren Migration in entzündete Hautareale unterstützt⁸⁶.

Die Modifikationen des PSGL-1-Proteingerüsts mit Kohlenhydratstrukturen sind maßgeblich für dessen variable Affinität zu den drei Selektinen und stellen eine Folge des unterschiedlichen Einflusses von α -1,3-Fucosyltransferasen dar⁸⁵.

Neben der Expression von PSGL-1 auf Leukozyten konnte der Ligand auch auf murinen sowie humanen Thrombozyten nachgewiesen werden, wobei dessen Expression durch Thrombin erhöht wird. Allerdings ist der Gehalt auf Thrombozyten 25-100fach geringer als auf Leukozyten und scheint mit dem Altern der Blutplättchen abzunehmen. Durch die Bindungsfähigkeit des thrombozytären PSGL-1 an P-Selektin und die Vermittlung von Thrombozyt-Endothel-Interaktionen *in vivo* wurde seine Relevanz als Ligand deutlich. Obwohl die biologische Bedeutung dieser Ergebnisse weiter untersucht werden muss, schlagen die Autoren aufgrund des Leukozyt-analogen Verhaltens ein breiteres Wirkungsspektrum der Thrombozyten vor, das über eine alleinige Funktion bei der Hämostase hinausgeht⁸⁷.

Da Costa Martins und Mitarbeiter zeigten 2007, dass auch Endothelzellen PSGL-1 auf mRNA- und Proteinlevel exprimieren. Dieser endotheliale PSGL-1 (ePSGL-1) ist funktionsfähig und vermittelt „tethering“ und Adhäsion von Monozyten oder Thrombozyt-Monozyt-Komplexen an aktiviertem Endothel unter Flussbedingungen. Die Expression von ePSGL-1 scheint konstitutiv zu erfolgen, da eine Stimulation des Endothels mit inflamma-

torischen Agentien wie TNF- α , IL-1 β oder Thrombin zu keiner Veränderung hinsichtlich des ePSGL-1-Gehalts führte. Allerdings wurde die Bindungsfähigkeit von Monozyten oder P-Selektin-Fc-Chimären durch eine TNF- α -Behandlung des Endothels erhöht, was das Resultat der TNF- α -induzierten Glykosylierung von ePSGL-1 zu sein scheint⁸⁸.

Die bisher beschriebenen Untersuchungen zeigen die Bindungsfähigkeit von PSGL-1 an Selektine auf. Es soll an dieser Stelle kurz erwähnt werden, dass darüber hinaus eine Interaktion von leukozytärem PSGL-1 mit dem Haut-assoziierten Chemokin CCL27 besteht. Dieses vermittelt T-Zell-Migration bei Kontakt- und atopischer Dermatitis. Die Wechselwirkung zwischen PSGL-1 und CCL27 erfolgt in Analogie zur L- und P-Selektin-Bindung abhängig von sulfatierten Tyrosinresten, wobei allerdings drei Tyrosine sulfatiert sein müssen, wogegen weder O- noch N-Glykane zur Bindung beitragen. Die Relevanz dieser Interaktion ist nicht eindeutig geklärt. Es wird u. a. eine protektive und regulierende Funktion angenommen, die aufgrund der Bindung von PSGL-1 an das Chemokin auf einer geringeren Chemokinrezeptor-vermittelten Chemotaxis der T-Zellen zu CCL27 beruht⁸⁹.

CD24 besteht aus einem kleinen Proteinkern von 27 Aminosäuren, die stark glykosyliert sind. Über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker ist CD24 in der Zellmembran verankert. Fast die Hälfte der Aminosäuren besteht aus Serin und Threonin, welche potentielle Stellen für O-verknüpfte Glykane darstellen. CD24 wird in frühen Phasen der B-Zell-Entwicklung und auf Neutrophilen in großem Maße exprimiert, fehlt jedoch auf normalen T-Zellen und Monozyten. In ausgereiften humanen Geweben ist CD24 nicht zu finden, jedoch in einer Vielzahl humaner Karzinome^{90,91}.

1995 wurde das zu CD24 homologe murine Molekül „heat stable antigen“ (HSA) erstmals als Ligand für P-Selektin beschrieben, das die Bindung von myeloiden Zellen spezifisch an endotheliales und thrombozytäres P-Selektin vermittelt, wobei diese Interaktion über sLe^x-haltige N-Glykane erfolgt⁹².

Wenig später wurde mit sLe^x modifiziertes CD24 als P-Selektin-Ligand auf PSGL-1-negativen, humanen Tumorzelllinien (Mammakarzinom, kleinzelliges Bronchialkarzinom) nachgewiesen. Der CD24/P-Selektin-Bindungsweg könnte demzufolge eine essentielle Rolle für die Dissemination von Tumorzellen durch die Förderung der Interaktion mit Thrombozyten oder Endothel spielen⁹³.

Weitere Studien demonstrieren die Bedeutung von CD24 im Adhäsionsgeschehen bei einer Vielzahl anderer Tumorzellen, wobei dessen Expression mit der Malignität korreliert und als prognostischer Marker genutzt werden kann⁹⁴⁻⁹⁶.

Neben PSGL-1 und CD24 sind Sulfatide, sulfatierte Galaktocerebroside, als weitere P-Selektin-Liganden identifiziert worden⁹⁷. Neben ihren physiologischen Funktionen, die beispielsweise die Aufrechterhaltung einer geclusterten Verteilung von spannungsabhängigen Na⁺- und K⁺-Kanälen innerhalb der Myelinscheiden, die Spermatogenese und Aggregation von Thrombozyten umfassen, haben sie in letzter Zeit in der Tumorforschung an Bedeutung gewonnen. Es konnte gezeigt werden, dass auf Krebszelllinien bestimmte Sulfatide existieren, die Wechselwirkungen mit P-Selektin eingehen und dadurch Interaktionen mit Thrombozyten vermitteln, was zu einer Metastasierung beiträgt⁹⁸ (s. Kapitel 2.5.2).

Der thrombozytäre GPIb/IX/V-Komplex besteht aus den vier Polypeptiden GPIb α und GPIb β , welche über eine Disulfidbrücke verbunden sind, sowie aus den nicht-kovalent assoziierten Einheiten GPIX und GPV. Der Komplex vermittelt in der Frühphase der primären Hämostase die Adhäsion von Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand, besonders bei hohem Scherstress, über die Bindung an von-Willebrand-Faktor (vWF), der auf dem Subendothel zugänglich wird. Er ist während der Aggregation mit bestimmten Tumorzellen hochreguliert, womit er bei dem Prozess der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaggregation beteiligt ist (s. Kapitel 2.5.2).

Die GPIb α -Einheit besitzt neben der Möglichkeit der Wechselwirkung mit vWF eine Bindungsstelle für Thrombin und nimmt an der Thrombozytenaktivierung teil⁹⁹. Darüber hinaus weist dieses Element Strukturähnlichkeiten zu PSGL-1 auf. Es ist ebenfalls ein membranäres, langgestrecktes Sialomucin mit stark O-glykosylierten Regionen und drei sulfatierten Tyrosinresten. Daher ist der GPIb/IX/V-Komplex in der Lage, mit P-Selektin in Wechselwirkung zu treten, was es Thrombozyten ermöglicht, über die Wirkung dieses Komplexes sowohl an Subendothel als auch an aktiviertem Endothel zu adhären¹⁰⁰.

Abschließend ist festzuhalten, dass Selektinliganden vielfältige Wirkprinzipien erfüllen, um hochaffine Bindungen zu erzielen, wobei folgende Parameter eine Rolle spielen:

1. die Art der erkannten Oligosaccharidsequenz,
2. die konzentrierte Präsentation der Kohlenhydratstrukturen (Clusterung), die in einer Multimerisierung von Bindungen resultiert,
3. die spezielle Anordnung der Bindungsepitope auf dem Proteingerüst und
4. posttranslationale Modifikationen des Proteins, z. B. Sulfatierung und Glykosylierung.

2.1.3 Die Adhäsionskaskade der Leukozyten

Der hochregulierte Prozess in postkapillaren Venolen, der zur Invasion von Leukozyten im Rahmen einer akuten oder chronischen Entzündung in betroffenes Gewebe führt, zeichnet sich durch die aufeinanderfolgende Wirkung verschiedener Adhäsionsmoleküle aus und wird daher als Adhäsionskaskade bezeichnet¹⁰¹.

Durch geschädigtes Gewebe werden zunächst Mediatoren wie Histamin oder Thrombin freigesetzt, die die typischen Symptome einer Entzündung hervorrufen. Desweiteren werden durch freigesetzte Zytokine (IL-1, TNF- α) spezifische Adhäsionsrezeptoren auf der Oberfläche von Endothelzellen ausgebildet. Beginnend mit dem sogenannten „tethering“ von Leukozyten kommt es zum ersten transienten Kontakt zwischen Leukozyten und Gefäßwand, was durch Sprünge der Zellen von ca. 50 μm gekennzeichnet ist. Nachfolgend auftretende schwachaffine Bindungen zwischen Leukozyten und endothelialen Adhäsionsmolekülen führen zu einer weiteren Verlangsamung auf eine Geschwindigkeit von ca. 20 $\mu\text{m/s}$, die sich deutlich von der Geschwindigkeit frei fließender Leukozyten (2 mm/s) unterscheidet. Dieses Phänomen wird als Zellrollen entlang des Endothels bezeichnet. Anfang der 90er Jahre konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den Adhäsionsmolekülen, die das „tethering“ und „rolling“ vermitteln, um Selektine handelt. Sie nehmen aufgrund der Initiierung der Adhäsionskaskade eine Schlüsselstellung ein, da durch eine gezielte Blockade der Selektinfunktion inflammatorische Prozesse kausal beeinflusst werden können.

Neben den Selektinen sind Integrine und Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie, zwei weitere Gruppen von Adhäsionsrezeptoren, entscheidend in die Rekrutierung von Leukozyten involviert, wie in Abb. 2-3 veranschaulicht.

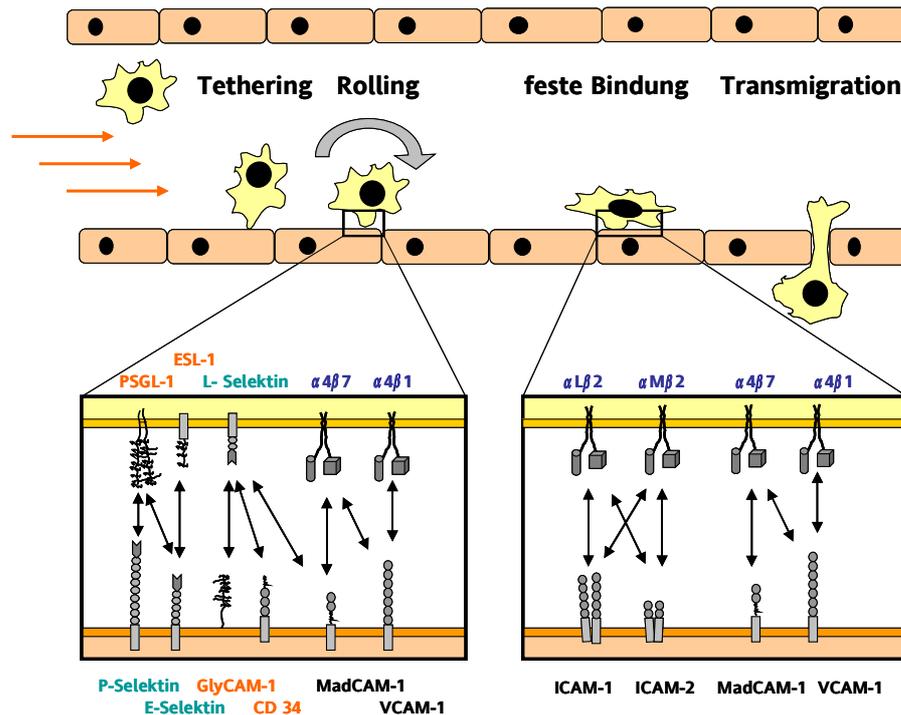


Abb. 2-3: Adhäsionskaskade der Leukozyten. Selektine initiieren den Prozess, der mit dem „tethering“ und „rolling“ von Leukozyten beginnt, während Integrine und deren Liganden aus der Immunglobulin-Superfamilie für feste Bindungen und die endotheliale Transmigration verantwortlich sind. ESL-1, „E-selectin ligand-1“; GlyCAM-1, „glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1“; ICAM, „intercellular adhesion molecule“; MadCAM-1, „mucosal addressin cell adhesion molecule-1“; PSGL-1, „P-selectin glycoprotein ligand-1“; VCAM-1, „vascular cell adhesion molecule-1“.
(modifiziert nach Bendas¹⁰²)

Nach der Selektin-vermittelten lokalen Anreicherung der Leukozyten, können diese ihrerseits durch endothelial freigesetzte Mediatoren wie Chemokine oder den Plättchen-aggregierenden Faktor (PAF) in einen aktivierten Zustand versetzt werden, was in einer Expression von leukozytären Integrinen ($\alpha 4\beta 7$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha L\beta 2$, $\alpha M\beta 2$) resultiert. Als Folge dessen werden Interaktionen mit ihren korrespondierenden endothelialen Liganden aus der Immunglobulin-Superfamilie (MadCAM-1, VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2) möglich, die eine feste Adhäsion unter Abflachung der Leukozyten am Endothel verursachen.

Der sich anschließende Prozess der Transmigration wird ebenfalls über Integrin-Ligand-Wechselwirkungen gesteuert. Maßgeblich ist das Immunglobulin „platelet/endothelial cell adhesion molecule-1“ (PECAM-1) beteiligt, welches homogene Bindungen zwischen den Endothelzellen schafft. Durch Interaktion der leukozytären Integrine an PECAM-1 werden diese Bindungen gelöst, wobei die Leukozyten in die resultierenden interzellulären Zwischenräume und somit in das entzündete Gewebe eindringen können¹⁰³.

Auf die Struktur und Funktion von Integrinen und Immunglobulinen soll in den folgenden Kapiteln ausführlicher eingegangen werden.

2.2 Integrine

Integrine stellen die größte Gruppe von Adhäsionsmolekülen dar. Sie kommen auf allen Zellarten vor und erfüllen ein breites Spektrum an Bindungsfunktionen. Durch die Integrin-vermittelte Verbindung („Integrierung“) des Zytoskeletts der Zellen mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix (EZM) liefern sie diverse Informationen über deren Lokalisation im Körper und ihr näheres zelluläres Umfeld¹⁰⁴. Desweiteren dienen sie der Fixierung von Gewebeverbänden und der Steuerung von Bewegungen und Wachstum. Neben der Zell-Matrix-Bindung vermitteln Integrine vielfältige Zell-Zell-Wechselwirkungen.

Es handelt es sich bei diesen Adhäsionsrezeptoren um langgestreckte Heterodimere, die aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut sind. Bislang sind 18 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt, die durch unterschiedliche Kombinationen mindestens 24 funktionelle Integrine ergeben. Die Klassifikation der Integrine kann entsprechend ihrer β -Untereinheit in zwei Subfamilien ($\beta 1$, $\beta 2$) erfolgen (Abb. 2-4). Die Ligandspezifität beruht auf der jeweiligen α/β -Kombination.

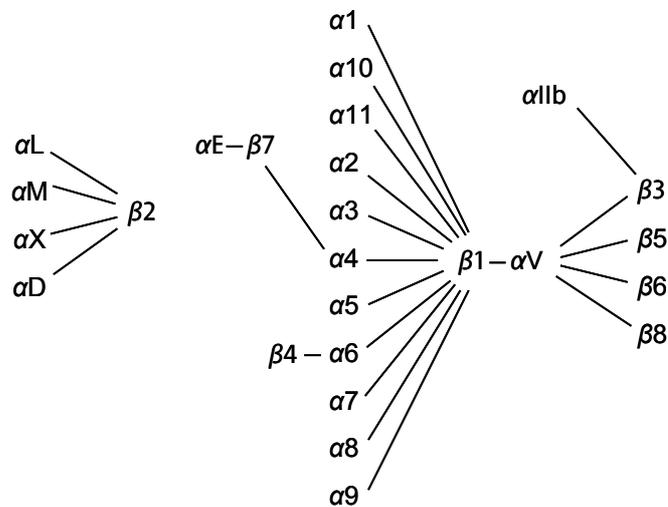


Abb. 2-4: Die Integrinfamilie. Die unterschiedlichen α - und β -Untereinheiten ergeben mindestens 24 funktionelle Integrine.

Die größte Subfamilie bilden $\beta 1$ -Integrine, die hauptsächlich Zell-Matrix-Bindungen vermitteln. Die Liganden dieser Untergruppe sind demnach Moleküle der EZM wie Fibronectin, Vitronectin, Laminin und Kollagen. Eine Ausnahme stellt das Integrin $\alpha 4\beta 1$ („very late activation antigen-4“, VLA-4) dar, welches neben Fibronectin das „vascular cell adhesion

molecule-1“ (VCAM-1) aus der Immunglobulin-Superfamilie bindet und somit eine Doppelfunktion ausübt. Auf VLA-4 und VCAM-1 wird in Kapitel 2.2.3 bzw. 2.3.1 ausführlicher eingegangen.

Die β 2-Integrine werden exklusiv auf Leukozyten exprimiert und sind damit für die Emigration der Leukozyten im Rahmen der Adhäsionskaskade und das „homing“ von Lymphozyten von Bedeutung. Wichtige Vertreter aus dieser Gruppe sind das „lymphocyte function associated antigen-1“ (LFA-1; CD11a/CD18; α L β 2), welches mit einem Basislevel auf allen Leukozyten vorhanden ist, Mac-1 (CD11b/CD18; α M β 2), das in Granulozyten und Monozyten unter Aktivierung aus Speichergranula freigesetzt wird sowie CD11c/CD18 (gp150,95; α X β 2), das hauptsächlich von Gewebsmakrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert wird¹⁰⁵. Die wichtigsten Liganden dieser Integrine sind die endothelialen „intercellular cell adhesion molecules“ (ICAMs), die als ICAM-2 und ICAM-3 konstitutiv vorhanden oder wie ICAM-1 durch Zytokine induzierbar sind.

Ein weiteres nennenswertes Mitglied der Integrinfamilie stellt das α IIb β 3 (GPIIb/IIIa, CD41/61) dar, welches auf Thrombozyten lokalisiert ist und eine bedeutende Funktion bei der Blutgerinnung übernimmt, indem es nach Aktivierung mit Thrombin oder ADP durch eine Bindung an Fibrin die entstehenden Thromben vernetzt und stabilisiert. Weitere Liganden des α IIb β 3 sind u. a. Fibrinogen, Fibronectin und vWF. Seine Blockierung, die zu einer Thrombozytenaggregationshemmung führt, bietet einen therapeutischen Angriffspunkt im Rahmen der Infarktprophylaxe. Zusätzlich zu dieser physiologischen Funktion spielt α IIb β 3 eine bedeutende Rolle bei der Thrombozyt-vermittelten Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel und die EZM^{106,107}.

Darüber hinaus werden viele Integrine auf Tumorzellen exprimiert, was für das Adhäsionsgeschehen dieser Zellen von Bedeutung ist, wie später diskutiert werden soll.

2.2.1 Struktureller Aufbau der Integrine

Die α - und β -Untereinheiten der Integrine sind nicht-kovalent im Verhältnis 1:1 assoziiert und bestehen jeweils aus einer großen extrazellulären Domäne von >940 bzw. >640 Aminosäuren, wobei jede Untereinheit die Zellmembran nur einmal durchspannt. Integrine besitzen einen kurzen transmembranären Bereich und eine kleine zytoplasmatische Domäne ohne Enzymaktivität von 15-77 Aminosäuren für die α -Kette und 46-60 Aminosäuren für die β -Kette¹⁰⁸.

Beide Untereinheiten sind in eine Vielzahl weiterer Strukturelemente gegliedert, wie in Abb. 2-5 schematisch dargestellt ist.

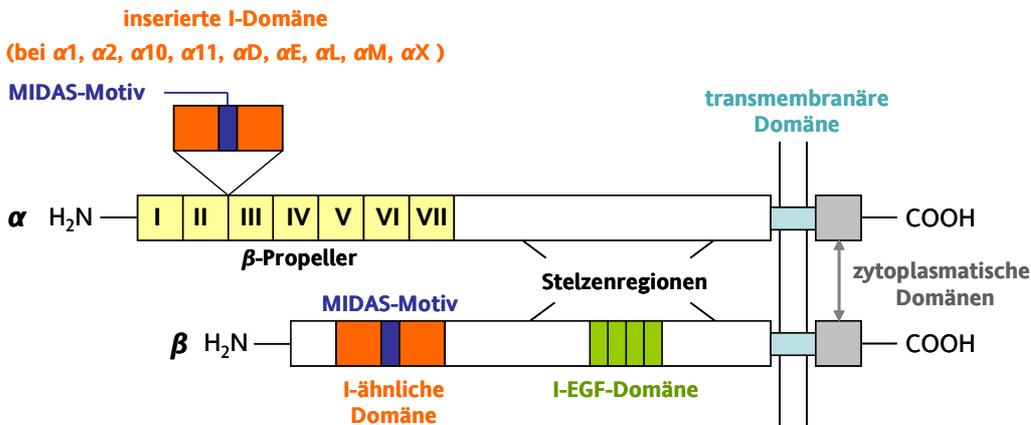


Abb. 2-5: Integrinstruktur. Darstellung eines Heterodimers unter Angabe der einzelnen Domänen. MIDAS, „metal ion-dependent adhesion site“; I-EGF, „integrin epidermal growth factor“. (modifiziert nach Mould¹⁰⁹ und Shimaoka et al.¹¹⁰)

Die α -Untereinheit ist aus dem β -Propeller, der I-Domäne (bei Integrinen $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, $\alpha 11$, αD , αE , αL , αM , αX), der Stelzenregion, einer transmembranären sowie einer zytoplasmatischen Domäne aufgebaut. Die N-terminalen sieben Segmente (Domänen I-VII) aus je 60 Aminosäuren nehmen die Konformation einer scheibenförmigen Struktur, den siebenschneidigen β -Propeller, an. Ungefähr die Hälfte der Integrine besitzt keine I-Domäne. In diesen Fällen scheint der β -Propeller direkt bei der Ligandbindung beteiligt zu sein¹¹¹. Bei Integrinen mit I-Domäne erfüllt der β -Propeller teilweise regulierende Funktionen bei der Wechselwirkung mit Liganden. Die I-Domäne, aufgrund hoher Homologie auch als vWF-A-Domäne bezeichnet, setzt sich aus ungefähr 200 Aminosäuren zusammen und ist zwischen die β -Faltblätter II und III des β -Propellers inseriert. Sie stellt bei I-Domänen-positiven Integrinen die Hauptligandbindungsstelle dar und enthält das „metal ion-dependent adhesion site“ (MIDAS)-Motiv, eine konservierte Bindungsstelle für divalente Kationen. Dieses ermöglicht die Wechselwirkung mit negativ geladenen Resten des Liganden und übernimmt eine wichtige Funktion bei der Aktivierung der Integrine. Ein C-terminaler Linker aus etwa 20 Aminosäuren verknüpft die siebente α -Helix der I-Domäne mit dem β -Faltblatt III des β -Propellers. Aufgrund seiner ausreichenden Länge ist er flexibel und erlaubt Bewegungen, die zu einer Konformationsänderung der I-Domäne im Bereich des MIDAS-Motivs führen können (s. Kapitel 2.2.2.1). An den β -Propeller schließt sich extrazellulär ein etwa 500 Aminosäuren umfassender Bereich an, der als Stelzenregion bezeichnet wird. Über den transmembranären Bereich ist die α -Untereinheit der Integrine in

der Zellmembran verankert. Die zytoplasmatischen Domänen der α -Untereinheiten sind einander wenig homolog, besitzen jedoch ein hochkonserviertes membranproximales GFFKR-Motiv. Diese Aminosäuresequenz spielt eine wesentliche Rolle bei der Fähigkeit zur Ligandbindung und der Signalweiterleitung¹¹²⁻¹¹⁴.

Die β -Untereinheit enthält einen Abschnitt aus 250 Aminosäuren, der aufgrund eines vorhandenen MIDAS-Motivs, einer ähnlichen Sekundärstruktur und einer gewissen Sequenzhomologie der I-Domäne der α -Untereinheit ähnelt und daher als I-ähnliche Domäne bezeichnet wird. Ähnlich wie der β -Propeller übernimmt sie bei I-Domänen-negativen Integrinen die Funktion der Ligandbindung und reguliert die Ligandbindung bei Integrinen mit I-Domäne. An die I-ähnliche Domäne schließt sich die Stelzen-Region an. Sie enthält in der Nähe der transmembranären Domänen vier Cystein-reiche Segmente, die dem EGF-Modul ähnlich sind und als Integrin-EGF (I-EGF)-Domäne bezeichnet werden¹⁰⁹. Sie spielt bei der Aktivierung der Integrine eine wichtige Rolle (s. Kapitel 2.2.2.1). Die zytoplasmatischen Reste der β -Elemente sind im Gegensatz zu denen der α -Untereinheiten sehr homolog und besitzen ebenfalls ein membranahes hochkonserviertes Motiv (HRRR), welches mit der hochkonservierten Sequenz der α -Untereinheit interagiert¹¹⁵.

2.2.2 Aktivierung der Integrine

Eine besondere Eigenschaft der Integrine verglichen mit anderen Adhäsionsmolekülen ist deren rasche Aktivierung, die in einem Zeitraum von weniger als einer Sekunde bis zu einigen Minuten erfolgt. Diese Aktivierung befähigt zur Ligandbindung, die in einer Zelladhäsion resultiert. Sie wird durch intrazelluläre Signalmoleküle verursacht, was als „inside-out signaling“ bezeichnet wird. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt bei Integrinen auf Thrombozyten und Leukozyten, wodurch sie ihre physiologischen Funktionen bei Verletzungen bzw. der Immunantwort sowie inflammatorischen Prozessen entfalten können.

Der Aktivierungszustand kann im wesentlichen durch zwei Ereignisse reguliert werden, auf die nachfolgend näher eingegangen wird.

2.2.2.1 Regulierung der Affinität

Affinitätsänderungen beruhen auf einer Konformationsänderung innerhalb der Ligand-bindungsstelle des Integrins, die physiologisch durch Chemokine oder artifiziell durch divalente Kationen wie Mn^{2+} und Mg^{2+} , monoklonale Antikörper oder Phorbolester verursacht werden kann. Anhand isolierter α M-I-Domänen konnte gezeigt werden, dass sie in zwei unterschiedlichen Konformationen kristallisieren¹¹⁶. Zunächst nach der Anwesenheit der verwendeten Kationen bezeichnet, erfolgte später eine Benennung in offene und geschlossene Konformation. Das Ausmaß der Konformationsänderung auf die Ligandbindungsfähigkeit wurde am Beispiel von α L-I-Domänen verdeutlicht. Während der K_D -Wert für die geschlossene Konformation 2 mM beträgt, nimmt er für die offene Konformation einen Wert von 200 nM an. Darüber hinaus schlagen die Autoren vor, dass die I-Domäne eines Integrinheterodimers nicht nur in zwei Konformationen vorliegen kann, sondern in einer Vielzahl von Zwischenstadien¹¹⁷.

Da die geschlossene Konformation an isolierten I-Domänen energetisch bevorzugt wird, stellt sie vermutlich die Standardkonformation inaktiver Integrine auf der Zelloberfläche dar. Ein Wechsel zur offenen Konformation benötigt demzufolge eine externe Energiezufuhr, die durch Bewegungen der einzelnen Domänen geliefert werden kann. Die wahrscheinlichste räumliche Veränderung ist eine Abwärtsbewegung der C-terminalen α -Helix, die aufgrund eines Zuges durch den C-terminalen Linker erfolgen kann („bell-rope model“¹¹⁸) (Abb. 2-6A). Der β -Propeller und die I-Domäne der α -Kette befinden sich in räumlicher Nähe zu der I-ähnlichen Domäne der β -Untereinheit. Daher ist es möglich, dass die Konformation der I-Domäne durch die Interaktion des C-terminalen Linkers mit dem β -Propeller und/oder der I-ähnlichen Domäne reguliert wird¹¹⁰.

Desweiteren treten Veränderungen auf, die die gesamte Struktur eines Integrinmoleküls betreffen. Die Kopfgruppe bestehend aus I-Domäne, I-ähnlicher Domäne und β -Propeller ist im inaktiven Zustand der Zellmembran zugewandt. Das „switchblade-like model“ schlägt ein Aufrichten des Integrinmoleküls vor, bei dem aufgrund einer Bewegung im Bereich der I-EGF-Module II und III die Stelzenregionen und zyttoplasmatischen Regionen auseinanderweichen, was den Zug des C-terminalen Linkers triggert. Diese Kombination aus scherenähnlicher Bewegung und dem Öffnen der geknickten Integrinstruktur ermöglicht es der Kopfgruppe, mit dem Liganden in Interaktion zu treten¹¹⁹ (Abb. 2-6B, obere Reihe).

2.2.2.2 Regulierung der Avidität

Die bisher beschriebenen strukturellen Veränderungen von Integrinen betreffen ein einzelnes Molekül. Darüber hinaus sind Clusterungen von Integrinen auf der Zelloberfläche bekannt, die zu multivalenten Interaktionen führen. Dieser Mechanismus wird als Aviditätsregulierung, gelegentlich als Valenzregulierung¹²⁰, bezeichnet.

Integrine sind durch temporäre Entkopplung vom Zytoskelett in der Lage, lateral durch die Zellmembran zu diffundieren. Zunächst bilden sie Mikrocluster, die sich folgend zu großen Aggregaten an einer Seite der Zelle zusammenschließen und „patch-like cluster“ formen¹²¹ (Abb. 2-6B, untere Reihe).

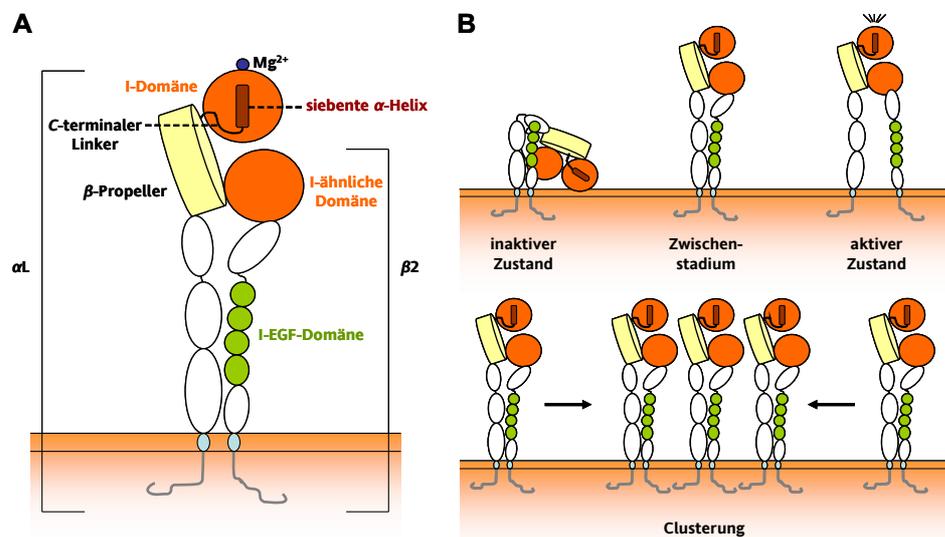


Abb. 2-6: Struktur und Regulierung. **A** Integrinstruktur am Beispiel des LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$) mit C-terminalem Linker, der eine Konformationsänderung der I-Domäne bewirken kann. **B obere Reihe** Regulierung der Affinität nach dem „switchblade-like model“¹¹⁹; **untere Reihe** Regulierung der Avidität durch Clusterung. (modifiziert nach Kinashi¹²⁰)

Abschließend soll erwähnt werden, dass in der Literatur diskutiert wird, ob die beschriebenen Konformationsänderungen und Aviditätserhöhungen jeweils Ursache oder Folge der Ligandbindung darstellen. Zunächst wurde angenommen, dass die Clusterung auf der Zelloberfläche (Aviditätserhöhung) eher für die Ligandbindung verantwortlich ist als die Affinitätserhöhung einzelner Rezeptoren¹²². Eine Clusterung würde in der Tat die Effektivität der Zellbindung erhöhen, besonders wenn die Liganden auf der korrespondierenden Zelle di- oder multivalent sind und eine vergleichbare Verteilung annehmen.

Andererseits wurde vorgeschlagen, dass eine Konformationsänderung von physiologischer Relevanz sei und einer Ligandbindung vorausgehe, da gezeigt werden konnte, dass

die Bildung von Clustern längere Zeit nach dem ersten Kontakt zwischen Integrin und Ligand auftritt, wogegen die Bindungsaffinität von Integrinen auf zirkulierenden Zellen innerhalb einer Sekunde erhöht werden muss. Demzufolge initiiert eine veränderte Konformation die Ligand- bzw. Zellbindung, wobei eine Clusterung der Integrine die Zelladhäsion weiter stabilisiert^{110,121}.

Weitere Untersuchungen bestätigen die Hypothese, wonach die Konformation entscheidend für die Wechselwirkung der Integrine mit ihren Liganden ist. Zwartz et al. untersuchten die Interaktion des Integrins $\alpha4\beta1$ (VLA-4) mit seinem Liganden VCAM-1, indem sie die Disaggregation von Zellaggregaten aus VCAM-1- und VLA-4-positiven Zellen unter dem Einfluss divalenter Kationen charakterisierten. Sie konnten zeigen, dass durchschnittlich nur $1,5 \pm 0,7$ Bindungen die Zellaggregate zusammenhalten, was zu der Schlussfolgerung führt, dass die durch die Kationen erhöhte Aggregation eine Folge der Affinitätsänderung des Integrins ist und nicht aus einer Clusterung oder erhöhter Bindungsanzahl resultiert¹²³.

Allerdings ist festzuhalten, dass die Prozesse der Konformationsänderung bzw. Aviditätserhöhung nicht zwangsläufig getrennt voneinander ablaufen, sondern oft zur selben Zeit auftreten können¹²⁰.

Neben der Vermittlung von Adhäsionsereignissen entfalten Integrine durch „outside-in signaling“ vielfältige Funktionen als Signalrezeptoren, die Morphologie, Wachstum und Differenzierung der Integrin-exprimierenden Zelle beeinflussen¹²⁴. Auf die Vielzahl der Signalkaskaden, in die Integrine involviert sind, wird im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen. Allerdings soll die Bedeutung des Aktivierungszustandes der Integrine für das „outside-in signaling“ kurz erwähnt werden.

Es wird zum einen angenommen, dass nach erfolgter Ligandbindung die Clusterung der Integrinmoleküle für die „outside-in“-Signaltransduktion verantwortlich ist¹²⁵. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Clusterung auch bei diesem Prozess nicht die dominante Rolle spielt, da gezeigt werden konnte, dass eine alleinige Clusterung nicht ausreichend ist, um volle Signalereignisse zu erzielen¹²⁶. Vielmehr stabilisiert oder induziert die Ligandbindung Veränderungen in den transmembranären und zytoplasmatischen Domänen, die die Signaltransduktion vermitteln. Möglicherweise wird das „outside-in signaling“ als eine Summe aus intermolekularer Clusterung und intramolekularer Konformationsmodulierung erreicht¹¹⁰.

2.2.3 Very late activation antigen-4 (VLA-4, $\alpha 4\beta 1$)

Das Integrin VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$, CD49d/CD29) gehört zur VLA-Proteinfamilie. Nachdem zunächst zwei Vertreter charakterisiert wurden, die erst spät nach T-Zell-Aktivierung auf der Zelloberfläche erscheinen und daher als „very late activation antigens“ bezeichnet wurden, erfolgte 1987 die Identifizierung dreier weiterer Mitglieder. Alle Integrine der VLA-Familie unterscheiden sich in ihrer α -Untereinheit voneinander, weisen jedoch eine identische β -Untereinheit auf¹²⁷.

Die α -Kette von VLA-4 hat ein Molekulargewicht von 150 kD und ist mit der 130 kD schweren β -Kette nicht-kovalent assoziiert. Es wurde v. a. auf Lymphozyten und Monozyten nachgewiesen¹²⁸.

Die humane $\alpha 4$ -Untereinheit wurde bereits zwei Jahre später sequenziert, wobei u. a. aufgeklärt werden konnte, dass VLA-4 keine inserierte I-Domäne aufweist. Aufgrund weiterer Strukturunterschiede zu damals bereits sequenzierten α -Ketten und dem Befund, dass monoklonale VLA-4-Antikörper die zytolytische, gegen B-Zellen gerichtete T-Zell-Aktivität inhibierten, schlugen die Autoren eine Funktion von VLA-4 bei Zell-Zell-Interaktionen vor¹²⁹. Die Ergebnisse von Holzmann et al. unterstützten diese Hypothese, da sie zeigen konnten, dass das murine Äquivalent von VLA-4 als lymphozytärer „homing“-Rezeptor auf HEVs agiert¹³⁰.

Inzwischen ist bekannt, dass VLA-4 neben der Matrixbindung zu Zell-Zell-Wechselwirkungen beiträgt, während die anderen Mitglieder der VLA-Familie ausschließlich $\beta 1$ -typische Zell-Matrix-Bindungen vermitteln. Als Matrixrezeptor bindet es an Osteopontin und eine alternativ gespleißte Domäne von Fibronectin („connecting segment-1“, CS-1), die sich von der klassischen Bindungsstelle, welche von VLA-5 erkannt wird, unterscheidet. Als Zellrezeptor bindet es an die Domänen 1 und 4 des endothelialen VCAM-1, welches der Immunglobulin-Superfamilie angehört (s. Kapitel 2.3.1).

Aufgrund derartiger Zell-Zell-Wechselwirkungen vermittelt VLA-4 Adhäsionsereignisse von Leukozyten (Eosinophile, Basophile, NK-Zellen, Monozyten, B- und T-Zellen) am Endothel und trägt somit zur Rekrutierung weißer Blutzellen in entzündetes Gewebe bei. Wie im Kapitel 2.2.2 erläutert, können Integrine in verschiedenen Aktivierungszuständen vorliegen, was in unterschiedlichen Dissoziationskonstanten (k_{off}) resultiert. Die k_{off} -Werte für die VLA-4/VCAM-1-Bindung sind mit 0,02-0,2/s vergleichbar mit denen anderer Integrine, die typischerweise etwa eine Zehnerpotenz niedriger als die der Selektine sind. Hohe Dissoziationsraten von Adhäsionsmolekülen sind gewöhnlich mit Zellrollen assoziiert, während geringe Dissoziationsraten zu fester zellulärer Adhäsion führen. Liegt VLA-4 in seiner

schwachaffinen Form vor, werden k_{off} -Werte erreicht, die im Bereich der Selektine liegen (2,4/s für die P-Selektin/PSGL-1-Interaktion¹³¹). VLA-4 im hochaffinen Stadium weist dagegen Integrin-typische k_{off} -Werte auf. Diese Eigenschaft erlaubt VLA-4 in Abhängigkeit seiner Affinität sowohl bei Zellrollen als auch bei fester Adhäsion eine aktive Rolle zu spielen^{123,132}. Interessanterweise exprimieren T-Zellen VLA-4 in unterschiedlich affiner Form nebeneinander. Unstimulierte T-Zellen weisen neben schwachaffinem VLA-4 einen gewissen Anteil an konstitutiv exprimiertem hochaffinem VLA-4 auf. Eine im Blut zirkulierende T-Zelle könnte demnach entweder über ihr schwachaffines oder ihr hochaffines VLA-4 an VCAM-1 binden, was zum „tethering“ der Zelle führt. Im ersten Fall würden die schwachaffinen Interaktionen Zellrollen verursachen, bis hochaffines VLA-4 für die Bindung an VCAM-1 zugänglich ist. Im zweiten Fall würde eine initiale Wechselwirkung durch das hochaffine VLA-4 vermittelt werden, die stark genug ist, um zum sofortigen Arrest der Zelle beizutragen. Das konstitutiv exprimierte hochaffine VLA-4 fördert somit eine spontane, feste Zelladhäsion unter Umgehung einer exogenen Stimulation durch Chemokine und der Aktivierung zusätzlicher Integrine¹³³.

VLA-4 wird allerdings nicht nur auf Leukozyten exprimiert, sondern ist darüber hinaus auf bestimmten Krebszelllinien zu finden, was deren Adhäsion an das Endothel verursacht¹³⁴. Somit trägt das Integrin maßgeblich zur Metastasierung von Tumorzellen bei, was in Kapitel 2.5.6 eingehend diskutiert wird.

2.3 Die Immunglobulin-Superfamilie

Neben Selektinen und Integrinen vermitteln Proteine aus der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-SF) Adhäsionsereignisse von Zellen. Moleküle werden zur Ig-SF gezählt, wenn sie eine oder mehrere der homologen Ig-Einheiten aufweisen. Diese sind aus etwa 70-100 Aminosäuren aufgebaut und durch eine Serie nichtparalleler β -Stränge gekennzeichnet, die ein kompaktes, über eine Disulfidbrücke stabilisiertes „Sandwich“ aus zwei β -Faltblättern bilden¹³⁵. Vier Arten von Ig-Domänen (V, C1, C2 oder H, I) sind definiert worden. Jede besitzt eine typische Länge und unterschiedliche Anzahl an Aminosäuren zwischen den beiden stark konservierten Cysteinen, die die Disulfidbrücke bilden. Die V- („variable“)-Domäne unterscheidet sich von der C- („constant“)-Domäne durch eine zusätzliche Schleife und eine größere Aminosäurezahl zwischen den beiden Cysteinen. Der

I- („intermediate“)-Typ ist durch Sequenzmerkmale der V-Domäne gekennzeichnet, weist aber einen wesentlich kürzeren Abstand zwischen den Cysteinen auf.

Moleküle mit Ig-Domänen wurden erstmals 1966 beschrieben¹³⁶. Mittlerweile ist eine Vielzahl von Proteinen aus der Ig-SF bekannt, die aufgrund der Funktionsunterschiede in mehrere Gruppen, u. a. in Zelladhäsionsmoleküle, unterteilt werden. Die Adhäsionsmoleküle vermitteln sowohl homophile als auch heterophile Zell-Zell-Interaktionen¹³⁷ und tragen somit u. a. zur Organogenese bei. Zu den wichtigsten Vertretern zählen neben PECAM-1 (CD31, auf Endothelzellen, Thrombozyten, Neutrophilen, Monozyten) und „neural cell adhesion molecule“ (N-CAM, CD56, auf Nervenzellen) die bei der Adhäsionskaskade von Leukozyten beteiligten ICAMs und VCAM-1. Da in der vorliegenden Arbeit der Fokus ausschließlich auf VCAM-1 gelegt wurde, soll dieses Adhäsionsmolekül nachfolgend näher charakterisiert werden.

2.3.1 Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)

VCAM-1 (CD106) wurde unabhängig voneinander mit zwei unterschiedlichen Strategien identifiziert. Zum einen wurde durch Blockierungsexperimente mit monoklonalen Antikörpern ein durch TNF- α induzierbares 110 kD-Oberflächenprotein auf „human umbilical vein endothelial cells“ (HUVECs) charakterisiert und mit „inducible cell adhesion molecule-110“ (INCAM-110) benannt. Dieses vermittelt eine CD11a/CD18-unabhängige Adhäsion von mononukleären Leukozyten¹³⁸ und bestimmten Tumorzelllinien¹³⁹. Zum anderen wurde mittels Klonierung ein Adhäsionsmolekül auf TNF- α - oder IL-1-stimulierten HUVECs identifiziert und als VCAM-1 bezeichnet, das die Adhäsion von monozytären und lymphozytären Zelllinien unterstützt und aufgrund sechs vorhandener Ig-Domänen der Ig-SF zugeordnet wurde¹⁴⁰. Zunächst erfolgte die Einteilung in den C2- oder H-Typ, nachfolgend aufgrund seiner späteren Identifizierung in den I-Typ¹⁴¹.

Da der monoklonale, gegen INCAM-110 gerichtete Antikörper spezifisch an VCAM-1-transfizierte Zellen bindet, konnte die Identität beider Adhäsionsmoleküle belegt werden¹³⁸.

Fast zur selben Zeit wurde mit dem Integrin VLA-4 ein Bindungspartner für VCAM-1 beschrieben, wobei gezeigt werden konnte, dass die Wechselwirkung nicht über die Fibronectin-Bindungsstelle von VLA-4 vermittelt wird. Die Autoren postulierten, dass das VLA-4/VCAM-1-Bindungspaar eine bedeutende Rolle bei der Rekrutierung mononukleärer Leukozyten in entzündete Gefäßareale spielen könnte¹⁴². Damit konnte die zuvor aufge-

stellte Hypothese, wonach VLA-4 nicht nur Matrixbindungen, sondern auch Zell-Zell-Interaktionen vermitteln kann, eindeutig bewiesen werden (s Kapitel 2.2.3).

Mittlerweile sind neben VLA-4 weitere Integrine mit VCAM-1-Bindungsfähigkeit bekannt, die $\alpha 4\beta 7$, $\alpha D\beta 2$ und $\alpha M\beta 2$ einschließen.

Wie der Name bezeichnet, wird VCAM-1 auf vaskulären Zellen exprimiert, konnte jedoch auch auf anderen Zellarten nachgewiesen werden. Dazu zählen dendritische Zellen in lymphoiden Geweben und der Haut, Monozyten-ähnliche Zellen in der Leber (Kupferzellen) und dem Gehirn sowie einige epitheliale Zellen der Niere^{138,143}.

Neben seiner membrangebundenen existiert VCAM-1 auch in löslicher Form, was für eine Vielzahl von zelloberflächlichen Adhäsionsmolekülen beschrieben ist. Durch das „shedding“, die proteolytische, membran-nahe Spaltung, wird der extrazelluläre Bereich des Moleküls freigesetzt. Das „shedding“ gehört somit zu einem wichtigen posttranslationalen Mechanismus, von dem angenommen wird, die Funktion von Zelloberflächenproteinen zu regulieren¹⁴⁴. Beispielsweise konnte für L-Selektin *in vivo* die Bedeutung des „sheddings“ demonstriert werden, wie unter 2.1.1.2 bereits erwähnt wurde.

VCAM-1 kann Phorbol-ester-induziert durch die membrangebundene, Zn^{2+} -abhängige Metalloproteinase „tumor necrosis factor- α -converting enzyme“ (TACE) bzw. „a disintegrin and metalloproteinase-17“ (ADAM-17) in der Nähe der transmembranären Region gespalten werden, was zu der Freisetzung einer intakten VCAM-1-Ektodomäne führt¹⁴⁵. Desweiteren spielen die löslichen Proteasen Neutrophile Elastase und Cathepsin G eine Rolle bei der VCAM-1-Spaltung im Knochenmark, wodurch hämatopoetische Vorläuferzellen mobilisiert werden¹⁴⁶.

Die *in vivo*-Relevanz des „sheddings“ von VCAM-1 ist nicht eindeutig geklärt. Es wird eine regulatorische Funktion angenommen, da durch die Senkung des VCAM-1-Gehalts auf der Zelloberfläche die adhäsive Eigenschaft des Endothels abnimmt. Zum anderen könnte die intakte Ektodomäne weiterhin Funktionen erfüllen. Es wäre eine Interaktion mit leukozytären Integrinen möglich, was zu einer Senkung der Leukozytenrekrutierung im Bereich des Endothels führen würde¹⁴⁵.

Es soll erwähnt werden, dass die Plasmalevel löslicher Adhäsionsmoleküle in einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen erhöht sind¹⁴⁷. Somit scheint das „shedding“ auch in pathologischen Prozessen regulatorisch involviert zu sein, indem die krankhaft erhöhte Expression der Moleküle auf dem Endothel möglicherweise durch deren Entfernung kompensiert und die Akkumulation von Leukozyten verringert werden soll.

Wie bereits erwähnt, wurde VCAM-1 zunächst als Molekül mit sechs Ig-Domänen beschrieben (6d-VCAM-1)¹⁴⁰. Zwei Jahre später konnte eine neuartige VCAM-1-Form identi-

fiziert werden, die ein zusätzliches Ig-Modul zwischen der dritten und vierten Domäne aufweist (7d-VCAM-1)¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Es konnte gezeigt werden, dass 7d-VCAM-1 die vorherrschende Variante auf stimulierten HUVECs ist. Beide Formen sind das Produkt eines Gens und werden durch alternatives Spleißen erhalten, wobei in der 7d-VCAM-1-mRNA ein zusätzliches Exon mit 276 Basenpaaren inseriert ist. Beide Varianten haben vergleichbare Bindungsaktivität gegenüber VLA-4-positiven Zellen. Das deutet darauf hin, dass das zusätzliche Modul 4 für eine Interaktion mit Integrinen nicht essentiell ist. Tatsächlich übernimmt Modul 1 die Integrinbindung, Modul 4 kann jedoch dazu beitragen¹⁵⁰. In Abb. 2-7 ist die VCAM-1-Struktur für beide Spleißvarianten dargestellt.

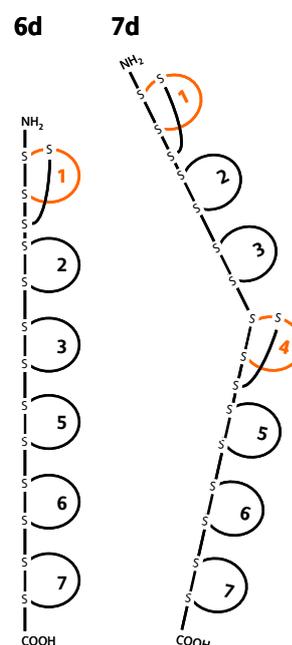


Abb. 2-7: Struktur von VCAM-1. 6d-VCAM-1 beinhaltet sechs Ig-Domänen, während 7d-VCAM-1 ein zusätzliches Modul 4 aufweist. Die potentiellen Integrinbindungsstellen sind in orange dargestellt. (modifiziert nach Barthel et al.¹⁵¹)

Wie aus der Abbildung ersichtlich, weist 7d-VCAM-1 im Bereich des vierten Moduls eine charakteristische Beugung auf, die das Molekül an dieser Stelle flexibel und anfällig für eine mögliche Proteolyse macht. In der Tat ist eine Spaltung von 7d-VCAM-1 beschrieben, die sich von dem o. g. „shedding“, welches vollständige extrazelluläre Domänen liefert, unterscheidet. Barthel et al. klärten 2006 auf, dass lösliches 7d-VCAM-1 zwischen dem dritten und vierten Ig-Modul durch Thrombin gespalten werden kann. Dabei entstehen zwei Produkte unterschiedlicher Größe. Das 33 kD-Produkt enthält die Module 1-3, ein 44 kD großer Teil repräsentiert die Module 4-7. Beide Produkte entfalten Bindungsak-

tivität gegenüber Eosinophilen, wobei das 33 kD-Produkt potenter ist. Demzufolge sind beide Integrinbindungsstellen in 7d-VCAM-1 aktiv, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Liegt 7d-VCAM-1 in membrangebundener Form vor, ist eine analoge Spaltung durch Thrombin möglich und führt im Gegensatz zu 6d-VCAM-1 zu einer Reduktion der Adhäsion eosinophiler Granulozyten. Die Spaltung resultiert in der Freisetzung eines Fragments bestehend aus den Ig-Modulen 1-3, wobei die Module 4-7 auf der Zelloberfläche verbleiben. Thrombin spaltet demnach nur 7d-VCAM-1, nicht jedoch 6d-VCAM-1, welches kein Ig-Modul 4 besitzt. Funktionelle Konsequenzen könnten nach Meinung der Autoren eine Zellbindung an das lösliche Fragment via Modul 1 und die Interaktion von Zellen mit dem gekürzten membrangebundenen VCAM-1 über die Integrinbindungsstelle in Modul 4 sein¹⁵¹. Die Erkennung des letzteren unterscheidet sich von der Bindung über Modul 1 in 6d- und 7d-VCAM-1, da Modul 4 eine größere räumliche Nähe zur Zelloberfläche aufweist. Während Zelladhäsionen unter Flussbedingungen ausschließlich von Modul 1 vermittelt werden, werden bei Adhäsionen unter statischen Bedingungen beide Module genutzt¹⁵². Die Thrombin-vermittelte Proteolyse scheint neben dem Einfluss anderer Proteasen ein potentieller Regulator der adhäsiven Aktivität von 7d-VCAM-1 zu sein¹⁵¹.

Die Wechselwirkung von VCAM-1 mit unterschiedlichen Integrinen, wobei der Hauptbindungspartner das Integrin $\alpha 4 \beta 1$ (VLA-4) ist, eröffnet die zusätzliche Bindungsmöglichkeit Integrin-positiver Zellen, die nicht leukozytären Ursprungs sind. Wie bereits erwähnt, kann VLA-4 auf verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen werden, womit die VLA-4/VCAM-1-Interaktion einen potenten Adhäsionsmechanismus dieser Zellen an das Endothel darstellt. Ferner wird VCAM-1 in zahlreichen malignen Zellen und Geweben exprimiert. Auf die Bedeutung von VCAM-1 im Rahmen einer Krebserkrankung wird im Kapitel 2.5.6 eingegangen.

2.4 Cadherine

Der Vollständigkeit halber soll abschließend die Gruppe der Cadherine, eine weitere Klasse von Adhäsionsmolekülen, kurz vorgestellt werden. Sie stellen transmembranäre Glykoproteine dar, die Ca^{2+} -abhängig homophile Zell-Zell-Interaktionen in allen soliden Geweben des Organismus vermitteln und somit maßgeblich bei deren Entwicklung und Aufrechterhaltung der Struktur beteiligt sind. Als Vertreter der sogenannten klassischen Cadherine seien E (Epithel)-, N (Nerven-, Muskel und Endothelzellen)- und P (Plazenta und embryonales Gewebe)-Cadherin genannt.

Neben der Funktion bei der Stabilisierung interzellulärer Bindungen sind Cadherine in unterschiedliche Signalkaskaden involviert.

Entfällt die Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Bindung, kann eine erhöhte Mobilität und ein Verlust der Fähigkeit, bei Zellkontakt die Proliferation einzustellen (Kontaktinhibition), beobachtet werden. Das Ergebnis sind eine Invasion und unkontrollierte Proliferation von Zellen¹⁵³. Somit sind Cadherine neben Selektinen, Integrinen und Adhäsionsmolekülen aus der Ig-SF ebenfalls Gegenstand der Tumorforschung.

2.5 Die Bedeutung ausgewählter Adhäsionsmoleküle bei dem Prozess der hämatogenen Metastasierung

Aufgrund ihrer Fähigkeit, vielfältige Wechselwirkungen von Zellen mit Strukturen des Organismus zu vermitteln, sind Adhäsionsmoleküle bei einer Dysregulierung in pathologischen Prozessen beteiligt. Neben der Involvierung in eine Vielzahl entzündlicher Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Atherosklerose oder diabetischer Angiopathie, die durch eine überschießende Akkumulation von Leukozyten im Gewebe gekennzeichnet sind, stellen sie einen wichtigen Faktor im Metastasierungsgeschehen von Krebserkrankungen dar. Dieser hochkomplexe Prozess ist durch viele Einzelschritte charakterisiert, die maligne Tumorzellen durchlaufen müssen, um eine Metastasenbildung zu verursachen.

Nach dem Ablösen der Zellen von Primärtumor und Durchquerung der EZM erfolgt die Invasion, die sowohl in das Lymphsystem als auch in den Blutkreislauf erfolgen kann. Nachdem zunächst angenommen wurde, dass Tumorzellen zusammen mit der interstitiel-

len Flüssigkeit passiv in Lymphgefäße aufgenommen werden, brachten neuere Studien abweichende Erkenntnisse, wonach Tumorzellen aktiv in lymphatische Gefäße einwandern sowie durch die Produktion von Wachstumsfaktoren eine Lymphangiogenese verursachen¹⁵⁴. Es ist festzuhalten, dass die Bedeutung des Lymphsystems für die Tumorzellmetastasierung weitaus weniger untersucht ist als die des Blutsystems. Daher steht im Rahmen dieser Arbeit die hämatogene Metastasierung im Vordergrund.

In den nächsten Kapiteln wird der Verlauf der hämatogenen Metastasierung vorgestellt, der Einfluss von Thrombozyten beleuchtet sowie die Beteiligung von Selektinen und VLA-4/VCAM-1 aufgezeigt.

2.5.1 Die metastatische Kaskade

Die Verbreitung von Tumorzellen im Organismus über den Blutkreislauf, die hämatogene Metastasierung, erfolgt durch eine Reihe komplex regulierter Prozesse, die unter dem Begriff „metastatische Kaskade“ zusammengefasst werden. Hierzu zählen lokale Invasion, Intravasation, Zirkulation, Adhäsion und Extravasation im Zielorgan, Überleben, Proliferation und Angiogenese. Schlägt einer dieser Schritte fehl, wird sich aus der betreffenden Zelle keine Metastase entwickeln. In den meisten Fällen gelingt es nicht, alle Schritte erfolgreich zu absolvieren. Zwar sind sogar kleine Tumore in der Lage, eine hohe Anzahl an Zellen in den Blutkreislauf freizusetzen, dennoch tragen nur etwa 0,01% der zirkulierenden Tumorzellen zu einer Metastasenbildung bei¹⁵⁵.

Die folgende Abbildung liefert zunächst einen Überblick über die Teilschritte der hämatogenen Metastasierung.

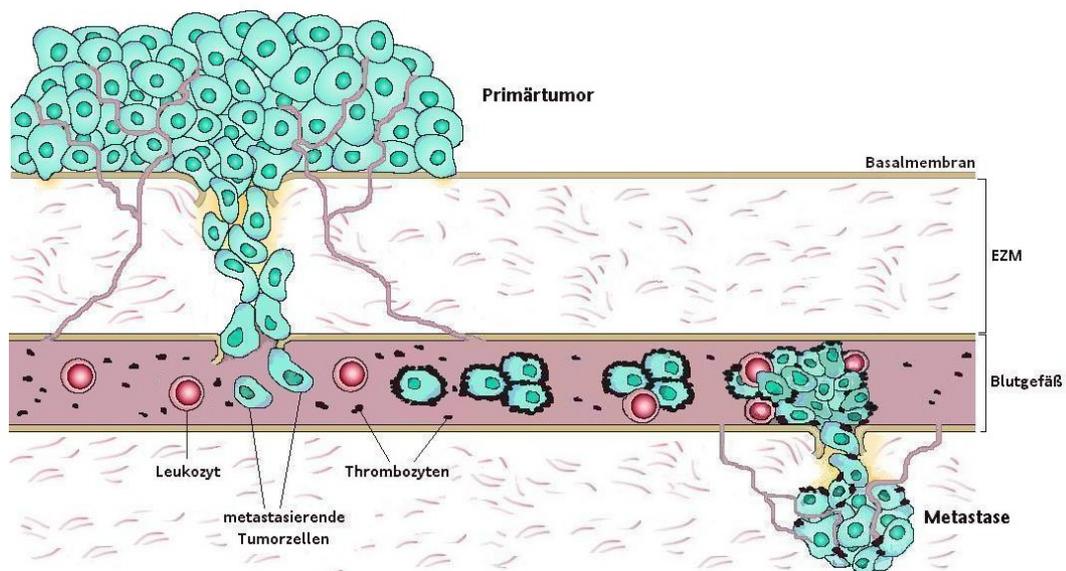


Abb. 2-8: Der Verlauf der hämatogenen Metastasierung. Von einem Primärtumor lösen sich einzelne Zellen ab, die nach Zerstörung der Basalmembran in die EZM eindringen. Nach deren Durchquerung erfolgt die Intravasation. In den Blutgefäßen finden vermutlich rasch Wechselwirkungen der Tumorzellen mit Leukozyten und Thrombozyten statt. Anschließend erfolgen Extravasation, Proliferation und Angiogenese. EZM, extrazelluläre Matrix. (modifiziert nach Aguirre-Ghiso¹⁵⁶ und Kannagi et al.¹⁵⁷)

Die metastatische Kaskade beginnt mit dem Ablösen einzelner Zellen aus dem Primärtumor als eine Folge des Verlustes von Zell-Zell-Kontakten, der beispielsweise auf einer erniedrigten Expression von Cadherinen beruhen kann¹⁵⁸. Die mobilisierten Tumorzellen sind in der Lage, durch die Sezernierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und anderen degradierenden Enzymen die EZM und die Basalmembran, die eine spezielle Form der EZM darstellt, abzubauen¹⁵⁹. Die Produktion dieser Enzyme korreliert dabei mit der Invasivität des Tumors. Die Degradierung der EZM ermöglicht deren Durchquerung, die zusätzlich dadurch erleichtert wird, dass viele Krebszellen im Vergleich zu normalen Zellen eine größere Fluidität der Membran und damit u. a. einhergehende erhöhte Elastizität aufweisen^{160,161}. Dies ermöglicht eine Bewegung durch das dreidimensionale Netzwerk der EZM, wobei einige Tumorzellen einen amöboiden Fortbewegungstyp annehmen¹⁶².

Im Anschluss an die Migration durch die EZM erfolgt die Intravasation, der eine Degradierung der Gefäßwände vorausgeht. Es wird postuliert, dass nach dem Eintritt der Zellen in das Blutgefäßsystem rasch eine Wechselwirkung mit Thrombozyten und Leukozyten stattfindet, was zu der Bildung von Mikroemboli führt (s. Kapitel 2.5.2 und 2.5.5).

Die Zirkulation im Blutkreislauf ermöglicht es den Tumorzellen, zu weit entfernten Stellen des Organismus zu gelangen. Intravaskulärer Arrest und Adhäsion an das Endothel resultieren in einer Extravasation. Unter günstigen Bedingungen proliferieren die Tumorzellen zu Mikrometastasen, die ab einer durchschnittlichen Größe von 2 mm den An-

schluss an das Gefäßsystem benötigen. Durch die Produktion bestimmter Wachstumsfaktoren, z. B. den „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), veranlassen sie die Angiogenese und sichern somit die Versorgung der wachsenden Metastase.

Normalerweise ist es Zellen nicht möglich, in einzelfremdem Gewebe zu überleben. Bei Kontaktverlust zu Nachbarzellen greift der Mechanismus der Anoikis, einer Sonderform der Apoptose aufgrund des Verlustes der Zelladhäsion. Im Gegensatz dazu fehlt Krebszellen diese Eigenschaft, was es ihnen erst ermöglicht, den Primärtumor zu verlassen und in fremder Umgebung zu proliferieren. Eine bedeutende Rolle nimmt dabei die Überexpression des Tyrosinkinase-Rezeptors TrkB ein, der eine Unterdrückung der Anoikis verursacht, was den betreffenden Zellen einen metastasierenden Phänotyp und verstärkte invasive Eigenschaften verleiht¹⁶³.

Weiterhin ist festzuhalten, dass das Verteilungsmuster der Metastasen nicht zufällig ist. Unterschiedliche Krebsarten zeigen eine gewisse Organpräferenz. Während beispielsweise Kolonkarzinome in Leber und Lunge metastasieren, neigen Mammakarzinome zu einer Metastasierung in Knochen, Leber, Lunge sowie Gehirn; Patienten mit Prostatakarzinom weisen häufig Knochenmetastasen auf. Die Ursachen dieser Organselektivität der Metastasierung sind seit langer Zeit Forschungsthema und bisher nicht eindeutig geklärt. Bereits im Jahr 1889 stellte Stephen Paget die „seed and soil“-Theorie auf. Demnach sind erfolgreiche adhäsive Interaktionen der Tumorzellen („seed“) mit der Umgebung eines bestimmten Organs („soil“) maßgebend für die Metastasenbildung in spezifischen Organen¹⁶⁴. Dieses „homing“-Konzept der Metastasierung wurde 1928 von James Ewing angefochten, der vorschlug, dass die Organselektivität auf der Gefäßversorgung des Primärtumors und mechanischen Faktoren beruht¹⁶⁵.

Krebspatienten können darüber hinaus eine rezidivierende Metastasierung entwickeln, die durch Latenzzeiten von einigen Jahren bis zu Jahrzehnten gekennzeichnet sein kann. In dieser asymptomatischen Phase sind Tumorzellen oder Mikrometastasen vorhanden, etablieren jedoch keine sichtbaren Tochtergeschwülste („cancer dormancy“). Die Mechanismen sind vielfältig und reichen von G0-G1-Arrest über verminderter Vaskularisierung bis zur Bekämpfung durch das Immunsystem. Werden die Ruhestadien verlassen, sind die Tumorzellen erneut in der Lage zu proliferieren, neue Gefäße zu bilden, dem Immunsystem zu entgehen und somit zu einer Rezidivierung der Erkrankung zu führen¹⁶⁶.

2.5.2 Der Einfluss von Thrombozyten auf die Metastasierung

Eine Assoziation zwischen Abnormalitäten in der Hämostase und Krebserkrankungen wurde 1865 von Armand Trousseau erstmals beobachtet. Er diagnostizierte an sich und mehr als 100 Patienten eine rezidivierende migratorische Thrombophlebitis als Begleiterscheinung eines okkulten viszeralen Karzinoms¹⁶⁶. Die Symptome resultieren aus der Bildung Thrombozyten-reicher Mikrothromben – begleitet von einer Thrombozytopenie – im arteriellen und venösen Gefäßsystem, was eine Entzündung der Gefäße verursacht. Dieses Krankheitsbild wurde später als Trousseau-Syndrom bezeichnet und wird meist etwas breiter verstanden, wobei jegliche Art der exzessiven Koagulation, die im Zusammenhang mit einer Krebserkrankung auftritt, gemeint ist. Bei ungefähr 15-20% der Patienten mit einer akuten venösen Thromboembolie (VTE) wird zum Zeitpunkt der Diagnosestellung oder in den Folgemonaten eine Tumorerkrankung nachgewiesen. Die Entwicklung thromboembolischer Ereignisse kann demzufolge einer Krebserkrankung vorausgehen und gilt häufig als erstes Anzeichen eines möglichen malignen Geschehens. Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit VTE das Risiko für eine Tumorerkrankung innerhalb des ersten Jahres drei- bis viermal höher ist als in der Allgemeinbevölkerung zu erwarten gewesen wäre^{167,168}. Dabei ist das Tumorrisiko bei Patienten mit idiopathischer Thrombose höher als bei Patienten, deren VTE sekundär nach Operation oder Trauma aufgetreten ist¹⁶⁹.

Das aktivierte Gerinnungssystem nimmt einen erheblichen Einfluss sowohl auf die Entwicklung von Tumorerkrankungen als auch auf deren Verlauf. Die Aktivierung kann durch eine Vielzahl von Faktoren verursacht werden und führt zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaggregation („tumor cell-induced platelet aggregation“, TCIPA), was bereits 1973 beschrieben wurde¹⁷⁰. Bei Jurasz et al.¹⁷¹ sind mögliche Mechanismen der TCIPA zusammengefasst. Tumorzellen stimulieren zum einen die Freisetzung proaggregatorischer Agentien wie ADP und TXA₂ aus den Granula der Thrombozyten. Zum anderen initiieren sie „tissue factor“ (TF)-vermittelt die Thrombinbildung und setzen TCIPA-stimulierende Proteinase wie Cathepsin B und MMP-2 frei, wobei letztere auch von den Thrombozyten selbst abgegeben werden kann.

Neben diesen Substanzen sind Adhäsionsmoleküle maßgeblich beteiligt. Eine besondere Rolle spielen thrombozytäres GPIIb/IIIa, GPIIb/IIIa und Tumorzell-ständiges α v β 3 sowie P- und L-Selektin, die bei einer Reihe Mucin-exprimierender Krebszellen mit dem Trousseau-Syndrom in Verbindung gebracht werden¹⁷². Auf die Bedeutung beider Selektine bei der Förderung der Metastasierung wird in den Kapiteln 2.5.4 und 2.5.5 ausführli-

cher eingegangen. Interessanterweise haben nicht nur Tumorzellen die Fähigkeit, die Rezeptorexpression der Thrombozyten zu stimulieren; auch Thrombozyten können die Expression von GPIb/IX/V und GPIIb/IIIa auf Tumorzellen steigern¹⁷³.

Die Erhöhung der Adhäsivität der Thrombozyten zieht eine Wechselwirkung mit Tumorzellen nach sich, was die Bildung von Aggregaten begünstigt. Die TCIPA hat neben dem Entstehen thromboembolischer Erkrankungen v. a. einen Einfluss auf die Metastasierung von Tumorzellen und korreliert mit deren metastatischem Potential. Die experimentelle Senkung der Thrombozytenzahl reduziert demnach z. B. die Anzahl von Lungen- und Knochenmetastasen in Tumorimplantationsmodellen¹⁷⁴. Die fördernden Effekte der Thrombozyten ergeben sich aus einer Vielzahl von Überlebensvorteilen für die Krebszellen, wie bei Jurasz et al.¹⁷¹ und Gupta & Massagué¹⁷⁵ aufgeführt:

1. Durch die Ummantelung mit Thrombozyten werden die Tumorzellen vor der zytotoxischen Aktivität durch NK-Zellen sowie vor hohen Scherkräften, die während der Zirkulationsphase auftreten, geschützt.
2. Die Bildung größerer Tumorzell-Thrombozyt-Aggregate kann zur Embolie von Mikrogefäßen und damit verbundenem intravaskulärem Arrest der Tumorzellen führen.
3. Thrombozyten fördern die Adhäsion von Tumorzellen an Leukozyten und Endothelzellen, was zur Extravasation beiträgt.
4. Nach dem Verlassen des Blutgefäßes verstärken zahlreiche thrombozytäre Faktoren Angiogenese und Wachstum der Tumorzellen sowie die spezifische Modulation der neuen Umgebung.

Wie die Ausführungen verdeutlichen, kann eine Inhibition der Thrombozytenfunktion die Metastasierung zurückdrängen. Die Schwierigkeit, die sich daraus für eine effektive Krebstherapie ergibt, liegt in der herausragenden Rolle der Thrombozyten in der Aufrechterhaltung einer normalen Hämostase. Eine modulierende Therapie der Metastasierung muss daher spezifisch auf die pathologische Tumorzell-Thrombozyt-Interaktion abzielen, ohne die physiologische Thrombozytenfunktion aufzuheben. Vielversprechend erscheint in diesem Zusammenhang die Inhibition von Integrin- und Selektin-vermittelten Adhäsionsereignissen, was deren Stellungwert als pharmazeutische Targets demonstriert.

2.5.3 Die Beteiligung von E-Selektin

Die Expression von E-Selektin prädestiniert zur direkten Wechselwirkung von zirkulierenden Zellen mit dem Endothel. Neben Leukozyten sind demnach Tumorzellen bei entsprechender Ligandausstattung in der Lage, mit diesem Adhäsionsmolekül zu interagieren, was möglicherweise eine Voraussetzung für deren transendotheliale Migration darstellt.

Im Zuge einer neoplastischen Transformation ist die Synthese bestimmter Oligosaccharide zugunsten einer erhöhten sLe^x- und/oder sLe^a-Bildung verschoben. Das veränderte Glykosylierungsmuster auf der Oberfläche von Tumorzellen trägt zur Bindungsfähigkeit an Selektine und somit zu einer Metastasierung bei^{157,176,177}. Die Serumlevel von sLe^x bzw. sLe^a sowie die der löslichen Selektine finden daher Einsatz als Tumormarker, da sie mit dem Verlauf der Krebserkrankung korrelieren und Rückschlüsse auf die Prognose ermöglichen¹⁷⁸⁻¹⁸⁰.

Bereits 1989 konnte von Rice & Bevilacqua gezeigt werden, dass E-Selektin *in vitro* die Adhäsion von Kolonkarzinomzellen der Linie HT-29 vermittelt¹³⁹.

Mehrere E-Selektin-Liganden sind bisher auf Tumorzellen identifiziert worden. Takada et al. demonstrierten anhand verschiedener *in vitro*-Inhibierungsstudien unter Einsatz monoklonaler Antikörper, dass sLe^x genau wie sLe^a einen Liganden für E-Selektin bei der Bindung humaner Krebszellen an IL-aktiviertes Endothel darstellt¹⁸¹. Die Bindungsfähigkeit von Tumorzell-ständigem sLe^a wurde von Zhang und Mitarbeitern bestätigt¹⁸². Eine weitere Studie wies das Vorkommen von sLe^x auf der Oberfläche von Mammakarzinomzellen nach, was zur E-Selektin-Bindung befähigt¹⁸³.

Für funktionsfähigen ESL-1 auf Tumorzellen konnten bisher keine existentiellen Beweise erbracht werden, allerdings ist eine PSGL-1-Expression auf humanen Prostatakarzinomzellen beschrieben worden, die mit einer Bindungsmöglichkeit für E-Selektin in Verbindung gebracht wurde⁴⁸ (s. Kapitel 2.1.2.1).

Das Adhäsionsmolekül CD44 wird auf Fibroblasten und hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert und spielt eine bedeutende Rolle bei Hämatopoese, Inflammation und Wundheilung. Es besitzt aufgrund alternativer Spleißvorgänge eine bemerkenswerte Heterogenität, die sich in dem Auftreten zehn verschiedener Varianten äußert (CD44v), die durch ein größeres Molekulargewicht als die Standardform CD44s gekennzeichnet sind. Während CD44s auf den oben genannten Zelltypen lokalisiert ist, finden sich Isoformen hauptsächlich auf endothelialen und epithelialen Zellen, aktivierten Lymphozyten sowie Tumorzellen. CD44s ist ein gut charakterisierter Rezeptor für Hyaluronsäure und anderen

EZM-Komponenten, fungiert darüber hinaus jedoch als hochaffiner E-Selektin-Ligand, wenn posttranslational Modifikationen, u. a. *N*-Glykosylierungen, erfolgen. Auf der Kolonkarzinomzelllinie LS174T konnten im Jahr 2005 E-Selektin-bindende CD44v-Isoformen identifiziert werden, die sich im Gegensatz zu CD44s durch *O*-Glykane auszeichnen¹⁸⁴. Die Expression dieses Moleküls auf Krebszellen korreliert mit einer schlechten Prognose und verstärkter Tumorprogression¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Später wurden für CD44-Varianten auf LS174T-Zellen zusätzlich Wechselwirkungen mit P- und L-Selektin¹⁸⁸ sowie kürzlich mit Fibrin¹⁸⁹ beschrieben, was die Beziehung zwischen erhöhten CD44v-Plasmaleveln und gesteigertem Metastasierungspotential erklären kann.

Der bereits im Kapitel 2.1.2.1 erwähnte DR3 wird ebenfalls auf Kolonkarzinomzellen exprimiert und vermittelt E-Selektin-induziert erhöhte Migration und ein gesteigertes Überlebenspotential dieser Zellen⁵¹.

Die Expression eines mit sLe^x modifizierten „core-2“-*O*-Glykans (C2-*O*-sLe^x), wie es typischerweise auf Leukozyten zu finden und v. a. durch eine P-Selektin-Bindungsfähigkeit gekennzeichnet ist¹⁹⁰, wurde als Ligand auf Kolonkarzinomzellen beschrieben, wobei dieses Glykan nicht auf dem PSGL-1-Grundgerüst exprimiert wird. C2-*O*-sLe^x vermittelt Wechselwirkungen dieser Zellen an E-Selektin unter Flussbedingungen, wobei P- und L-Selektin nicht gebunden werden, was die Beteiligung der C2-*O*-sLe^x/E-Selektin-Bindung im Hinblick auf eine mögliche Metastasierung demonstriert¹⁹¹.

Wie deutlich wird, sind besonders Kolonkarzinomzellen zu einer E-Selektin-Bindung befähigt. Anfang der 90er Jahre wurde postuliert, dass E-Selektin spezifisch die Adhäsion von Kolonkarzinomzellen vermittelt, da parallel untersuchte Melanom-, Osteosarkom-, Bronchial-, Zervix- und Nierenkarzinomzelllinien kein E-Selektin-vermitteltes Adhäsionsverhalten zeigten¹⁹². Später wurde die E-Selektin-Abhängigkeit allerdings auch bei Zellen anderer Tumorentitäten, u. a. Mamma- oder Prostatakarzinom beschrieben^{183,193}. In Analogie zum Prozess des Leukozytenrollens wurde dem E-Selektin die Vermittlung eines Rollverhaltens von Tumorzellen zugeschrieben¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Demnach resultiert die direkte Wechselwirkung der Krebszellen mit dem Endothel in einer Akkumulation der Zellen als Voraussetzung für eine Metastasierung. E-Selektin dient in diesem Zusammenhang als „homing“-Rezeptor für Zellen mit geeigneter Ligandausstattung¹⁹⁷.

Das Konzept der Organselektivität wird in vielen Fällen mit der Expression von E-Selektin begründet, wobei andere vaskuläre Zelladhäsionsmoleküle beteiligt sein können¹⁹⁸. Da deren Expression nicht konstitutiv erfolgt, sondern durch inflammatorische Stimuli induziert werden muss, wird die Assoziation zwischen dem Auftreten v. a. chronisch-entzündlicher Erkrankungen mit einer Begünstigung des Krebsgeschehens deutlich¹⁹⁹. Des-

weiteren können Tumorzellen selbst durch die Produktion von TNF- α , IL-1 β oder IFN- γ sowie Zytokin-unabhängig durch spezifische Kohlenhydratstrukturen²⁰⁰ das Endothel direkt aktivieren und somit die Expression von E-Selektin und anderen induzierbaren Adhäsionsmolekülen triggern. Eine indirekte Beeinflussung ist ebenfalls möglich. Durch den Eintritt in die hepatische Mikrozirkulation initiieren Tumorzellen eine schnelle Entzündungsantwort durch die Induktion der TNF- α -Produktion in Kupfferzellen, was wiederum die E-Selektin- und VCAM-1-Expression in endothelialen Zellen fördert²⁰¹. Eine Tumorzellbedingte Modulation der Rezeptorausstattung hepatischen Endothels tritt relativ häufig auf und ist für Kolonkarzinomzellen gut dokumentiert, was deren Metastasierung in die Leber erklären kann. In diesen Fällen scheint die „seed and soil“-Theorie zuzutreffen.

Die bisher erläuterten Befunde zeigen, dass entweder die erhöhte sLe^x- bzw. sLe^a-Ausstattung oder die gesteigerte E-Selektin-Expression durch Vermittlung von Bindungsereignissen der Tumorzellen am Endothel das Metastasierungs-geschehen fördert. Interessanterweise konnte 2005 anhand eines spontanen Metastasierungsmodells (Implantation eines Tumors) gezeigt werden, dass der Verlust von sLe^x möglicherweise die Metastasierung unterstützt, da dies zum Ablösen der Tumorzellen vom Primärtumor beiträgt. Demnach zeigten sLe^x-negative Varianten der untersuchten Mammakarzinomzellen reduzierte Zell-Zell-Adhäsion, erhöhte Motilität und gesenkte E-Selektin-Bindung *in vitro*, eine erhöhte Lungenmetastasierung sowie eine veränderte Morphologie von Primärtumor und Metastasen, die sich in einer aufgelockerten Gewebestruktur äußerte²⁰². Dem gegenüber steht jedoch eine große Anzahl klinischer Beobachtungen, wonach erhöhte Plasma-level löslichen E-Selektins und seiner Liganden mit einer schlechten Prognose für den Patienten verbunden sind^{178,203-205}.

2.5.4 Die Beteiligung von P-Selektin

Da E-Selektin nur durch *de novo*-Synthese gebildet werden kann, scheint es nicht für die sehr frühen Schritte der Tumorzelladhäsion verantwortlich zu sein. Die angestellten Betrachtungen, wonach E-Selektin alleinig beteiligt sein könnte, berücksichtigen zudem nicht den Einfluss von Thrombozyten. Eine Interaktion zwischen löslichen P-Selektin-Fc-Chimären und verschiedenen Karzinomgeweben und Karzinomzelllinien konnte schon zu Beginn der 90er Jahre gezeigt werden²⁰⁶. P-Selektin wird sowohl auf aktiviertem Endothel als auch auf aktivierten Thrombozyten rasch aus den Speichergranula freigesetzt (s. Kapitel 2.1.1.3). Es besteht demzufolge die Möglichkeit einer frühen P-Selektin-vermittelten In-

teraktion von Tumorzellen sowohl mit Thrombozyten als auch mit dem Endothel. Für beide Fälle existiert eine reichliche Zahl an Studien.

Unter Verwendung P-Selektin-beschichteter Oberflächen unter Flussbedingungen konnte die Bindung verschiedener Tumorzellen an endotheliales P-Selektin simuliert werden²⁰⁷⁻²⁰⁹. Der Ligand PSGL-1, exprimiert auf Leukozyten, vermittelt die Interaktion mit dem Endothel, was in Rollbewegungen resultiert. Die meisten epithelialen Krebszellen tragen kein PSGL-1, wodurch Leukozyten-analoges Zellrollen entlang eines P-Selektin-Substrats auszuschließen ist. In der Tat unterscheidet sich die Bindung von Tumorzellen erheblich von der der Leukozyten, was in dem Vorliegen anderer Liganden begründet ist. Es ist in der Literatur häufig von Rollbewegungen der Tumorzellen die Rede, deren Kinetik allerdings deutlich von der des Leukozytenrollens abweicht. Beispielsweise unterscheiden sich Bindungsstärke und k_{off} von LS174T-Kolonkarzinomzellen an P-Selektin signifikant von der PSGL-1-vermittelten Leukozyt/P-Selektin-Bindung (Bindungsstärke: LS174T < Leukozyt; k_{off} : LS174T > Leukozyt). Die Differenzen in diesen beiden Parametern äußert sich in unterschiedlichen Geschwindigkeiten, mit denen sich die Zellen unter Flussbedingungen fortbewegen ($8,0 \pm 0,7 \mu\text{m/s}$ für Leukozyten vs. $110 \pm 8,8 \mu\text{m/s}$ für LS174T)²⁰⁹. Der Ligand, der für diese Interaktionen verantwortlich ist, konnte später als das O-verknüpfte, sialylierte Glykoprotein CD44v identifiziert werden¹⁸⁸ (s. Kapitel 2.5.3).

Andere Arbeiten konnten das Vorliegen weiterer Tumorzell-assoziiierter Strukturen mit P-Selektin-Bindungsfähigkeit demonstrieren, zu denen Chondroitinsulfate²¹⁰ und Heparansulfat-ähnliche Proteoglykane gehören^{208,211}, wobei die Sulfatierung essentiell ist²¹².

Ein weiteres gut charakterisiertes Molekül, was P-Selektin-Wechselwirkungen unter Flussbedingungen vermittelt, ist das unter 2.1.2.3 vorgestellte CD24. Durch seine Expression auf bestimmten Tumorzelllinien, wobei eine Modifikation mit sLe^x notwendig ist, wird *in vitro* Zellrollen erzielt²¹³ sowie die Adhäsion der Tumorzellen im Lungengewebe gefördert⁹⁴.

Um die Rolle von P-Selektin *in vivo* zu demonstrieren, werden häufig P-Selektin-Knockout ($P^{-/-}$)-Mäuse genutzt, wobei vermutet wird, dass die damit einhergehende Senkung der Metastasierung eher der verminderten Thrombozytenfunktion zuzuschreiben ist als einer Blockade der Tumorzelladhäsion am Endothel¹⁵⁷. Allerdings konnte in einer Studie belegt werden, dass endotheliales P-Selektin zu einer Metastasierung beiträgt, da das Ausmaß der Metastasierungssenkung in $P^{-/-}$ -Mäusen (P-Selektin-Defizit auf Thrombozyten und Endothel) größer ist als in jenen, deren eigenes Knochenmark zerstört und durch Knochenmark von $P^{-/-}$ -Mäusen ersetzt wird (P-Selektin-Defizit auf Thrombozyten)²¹⁴. Die-

sen Ergebnissen zufolge vermittelt endotheliales P-Selektin eine Metastasierungssteigerung.

Interessanterweise korreliert eine Abnahme endothelialen P-Selektins im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (peri- und intratumoral, bei Primärtumor und Metastasen) mit der Progression (Kolorektalkarzinom, malignes Melanom). Durch die geringe, zum Teil fast fehlende P-Selektin-Expression wird die Leukozyteninfiltration in das Tumorgewebe vermindert, wodurch die Immunabwehr herabgesetzt ist. Im Gegensatz dazu weisen benigne Läsionen und Primärtumore, die keine Metastasen gebildet haben, signifikant höhere Level an P-Selektin auf^{215,216}. Schadendorf und Mitarbeiter ermittelten dagegen eine erhöhte vaskuläre P-Selektin-Expression in intratumoralen Bereichen von Primärtumoren (malignes Melanom), die mit dem Krankheitsverlauf korrelierte. Demnach waren zahlreiche P-Selektin-positive Gefäße mit einem schlechten klinischen Ergebnis assoziiert²¹⁷. Da neben P-Selektin eine Vielzahl anderer Adhäsionsmoleküle auf Endothelien exprimiert werden, ist die Interpretation schwierig und eventuell durch die Überlappung mehrerer Bindungsmechanismen beeinflusst.

Möglicherweise spielt das thrombozytäre P-Selektin die größere Rolle bei der Förderung der Metastasierung. Die positiven Effekte auf die Verbreitung von Tumorzellen, die sich durch eine Interaktion mit Thrombozyten ergeben, sind in Kapitel 2.5.2 beschrieben. Eine P-Selektin-vermittelte Wechselwirkung von Thrombozyten mit Tumorzellen des Neuroblastoms und kleinzelligen Bronchialkarzinoms wurde nachgewiesen, wogegen eine Beteiligung von GPIIb/IIIa ausgeschlossen wurde²¹⁸. An dieser Stelle ist allerdings zu berücksichtigen, dass GPIIb/IIIa-vermittelte Interaktionen durchaus auftreten, wobei die Oberflächeneigenschaften der Tumorzellen eine entscheidende Rolle spielen^{106,107,189,219-221}.

Im Tiermodell konnte eindrucksvoll die Bedeutung des thrombozytären P-Selektins gezeigt werden. $P^{-/-}$ -Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen sowohl ein signifikant langsames Wachstum s. c. implantierter humaner Kolonkarzinomzellen als auch weniger Lungenmetastasen nach i. v.-Injektion der Zellen. Dafür waren folgende Beobachtungen verantwortlich: (i) In $P^{-/-}$ -Mäusen gelangten die i. v.-applizierten Tumorzellen in geringerem Ausmaß in die Lungen. (ii) Die Thrombozyten von $P^{-/-}$ -Mäusen adhärten nicht an Tumorzell-Mucine. (iii) Die nach i. v.-Injektion in den Lungengefäßen befindlichen Tumorzellen waren häufig mit Thrombozyten assoziiert, was in $P^{-/-}$ -Mäusen drastisch reduziert war²²². Demnach beruht die Metastasierung auf einer Aggregation von Tumorzellen und Thrombozyten, die zu einem erheblichen Teil von P-Selektin vermittelt wird.

Die P-Selektin-Liganden auf Tumorzellseite sind hauptsächlich vom Mucin- oder Glykosaminoglykantyp. Allerdings wurde bereits 2002 auf der untersuchten Kolonkarzi-

nomzelllinie MC38 ein sulfatiertes Glykolipid vermutet²²³. Später wurde dieser Ligand als das Sulfatid SM4 identifiziert. Die SM4/P-Selektin-Bindung dient ebenfalls der Vermittlung von Thrombozyt-Tumorzell-Interaktionen und trägt zu einer Erhöhung der Metastasierungsrate bei⁹⁸.

Abschließend ist festzuhalten, dass hauptsächlich thrombozytäres P-Selektin einen Einfluss auf die Metastasierung von Krebszellen ausübt, wobei ein gewisser Anteil von endothelialelem P-Selektin übernommen wird.

2.5.5 Die Beteiligung von L-Selektin

L-Selektin vermittelt Leukozytenrollen sowie das „homing“ von Lymphozyten in periphere und mesenteriale Lymphknoten über die Erkennung von PNAds (s. Kapitel 2.1.1.2 und 2.1.2.2). Nach einer Entartung von Zellen des blutbildenden Systems, die zu verschiedenen Formen leukämischer Erkrankungen/maligner Lymphome führen können, werden häufig dieselben Adhäsionsmoleküle wie bei den vergleichbaren gesunden Zellen exprimiert. Daher wurde postuliert, dass sie zu den metastatischen Eigenschaften der Tumorzellen beitragen²²⁴. Ein Beispiel einer derartigen Erkrankung stellt das T-Zell-Lymphom dar. Die systemische Verbreitung der Lymphomzellen erfolgt nach maligner Transformation und Wachstum im Thymus in Organe wie Leber, Milz und Nieren sowie in die Lymphknoten. In einem Tiermodell konnte gezeigt werden, dass L-Selektin zum Wachstum des Lymphoms beiträgt, da L-Selektin-negative Lymphomzellen eine verminderte Fähigkeit aufwiesen, im Thymus einen Tumor zu etablieren. Zusätzlich wurden Effekte der untersuchten Selektine (E-, L- und P-) deutlich, die eine Metastasierungsbeeinflussung nach dem Übergang der Zellen in periphere Organe, vermutlich über die Induktion intrazellulärer Signale, wahrscheinlich machen. Eine Selektin-vermittelte Adhäsion als Ursache für eine Metastasierung des T-Zell-Lymphoms wurde demzufolge ausgeschlossen²²⁵.

Im Gegensatz dazu erzeugten Qian und Kollegen transgene Mäuse mit L-Selektin-exprimierenden Insulinomen und beobachteten eine Metastasenbildung in Lymphknoten, die durch L-Selektin-Antikörper blockierbar war. Somit fördert L-Selektin das „homing“ dieser Tumorzellen. Sie postulierten, dass jede Tumorzelle während der Progression eine L-Selektin-Expression aktivieren könnte, wodurch es eine Rolle bei der Metastasierung nicht-lymphoider Tumore in Lymphknoten spielt²²⁶.

Die beschriebenen Untersuchungen befassten sich mit der Expression von L-Selektin auf den Tumorzellen selbst. Dies ist hauptsächlich für Zellen leukozytären Ursprungs der

Fall. Allerdings zeigen verschiedene Kolonkarzinomzelllinien neben der Bindungaffinität zu E- und P-Selektin ein Adhäsionsvermögen an L-Selektin²²⁷. Daraus ergibt sich die Möglichkeit einer Interaktion mit Leukozyten, die in Abhängigkeit von der Leukozytenart in positiven oder negativen Effekten für die Tumorzellen resultiert.

L-Selektin kann (in Kooperativität mit ICAM-1) zu einer Infiltration zytotoxischer Lymphozyten in das Tumorgewebe beitragen und somit Wachstum und Lungenmetastasierung maligner Melanomzellen hemmen, wie anhand eines Tiermodells mit L-Selektin-, ICAM-1- sowie kombiniert defizienten Mäusen gezeigt werden konnte²²⁸. In einer Studie an Melanom-Patienten wurde ermittelt, dass eine Erniedrigung des Serum-L-Selektins, dagegen ein Anstieg an löslichem ICAM-1, mit einer Progression der Erkrankung verbunden sind. Der Anstieg an Serum-ICAM-1 kann in der Expression dieses Moleküls auf den Melanomzellen, inflammatorischen Zellen und dem Endothel begründet liegen. Niedrige L-Selektin-Level könnten aus einer Melanom-vermittelten Suppression der Leukozytenaktivierung resultieren²²⁹. In einer Studie an Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom wurden dagegen erhöhte Serum-L-Selektin-Level mit fortschreitender Erkrankung beobachtet, wobei lösliches L-Selektin die Adhäsion von Leukozyten an aktiviertes Endothel blockiert und somit eine Immunantwort herabgesetzt wird²³⁰. Die Interpretation der L-Selektin-Level in Patientensera scheint demnach komplex und abhängig von der Tumorart zu sein.

Allerdings können auch metastasierungsfördernde Effekte durch die Beteiligung von Leukozyten erreicht werden. Die Wechselwirkung von membrangebundenen und löslichen Mucinen von Kolonkarzinomzellen mit L-Selektin resultiert in einer Bindung, wobei multiple Bindungsstellen für jedes der drei Selektine auf den Mucinen vorhanden sind und zum „cross-linking“ führen können. Ferner kann die Mucin-induzierte Adhäsion der Leukozyten an HUVECs teilweise durch L-Selektin-Antikörper vermindert werden. L-Selektin trägt somit zur Bildung von Mikroemboli und Adhäsion der Tumorzellen bei²³¹.

An L-Selektin-defizienten Mäusen konnte die Beteiligung dieses Moleküls *in vivo* demonstriert werden, da ein Mangel an L-Selektin die Lungenmetastasierung von Kolonkarzinomzellen senkte. Es konnte gleichzeitig belegt werden, dass Granulozyten und/oder Monozyten für die Metastasierung verantwortlich sein müssen, da die Studie an B- und T-Zell-defizienten Mäusen durchgeführt wurde. Interessanterweise konnte zusätzlich der synergistische Effekt von L- und P-Selektin deutlich gemacht werden. Eine Kombination aus L- und P-Selektin-Defizit in PL^{-/-}-Mäusen führte im Vergleich zu L^{-/-}-Mäusen zu einer weiteren Abschwächung der Ausbreitung maligner Zellen, wobei angenommen wurde, dass L-Selektin zu einem späteren Zeitpunkt als P-Selektin agiert. Für *in vivo*-Bedingungen ist

anzunehmen, dass die Interaktion von Thrombozyten und Tumorzellen eine direkte Bindung der Leukozyten (teilweise) verhindert (s. Kapitel 2.5.2). Daher wurde vorgeschlagen, dass L-Selektin-vermittelte Signalmechanismen, begleitet von einer Leukozytenaktivierung, die Metastasierung verstärken. Die Freisetzung von Zytokinen in der Umgebung der Tumorzellen könnte wichtig für deren Überleben und Extravasation sein. Eine Möglichkeit wäre eine simultan auftretende Interaktion L-Selektin-positiver Leukozyten mit Endothelzellen und der äußeren Region von Tumorzell-Thrombozyt-Emboli über thrombozytäres P-Selektin und leukozytären PSGL-1. Somit könnte eine Passage der Tumorzellen durch die endotheliale Barriere ermöglicht werden. Um dies zu realisieren, müssten jedoch endogene endotheliale L-Selektin-Liganden exprimiert werden²²³. Wie im Kapitel 2.1.2.2 erläutert, ist das Vorkommen der PNAds nicht nur auf HEVs beschränkt, sondern kann während chronisch-entzündlicher Zustände auch auf nicht-lymphoiden Endothelzellen induziert werden⁵². Es wurde ferner vermutet, dass die Phase der Extravasation erst nach einer Periode intravaskulärer Proliferation der Tumorzellen abläuft²³². Somit wäre ausreichend Zeit vorhanden, bis die L-Selektin-Liganden an der Endotheloberfläche erscheinen. Diese Hypothese wurde im Jahr 2006 bestärkt. Es konnte aufgeklärt werden, dass der intravaskuläre Arrest der Tumorzell-Mikroemboli von einer temporären Induktion Fucosyltransferase-7 (*Fut7*)-abhängiger Selektinliganden begleitet ist. Somit ist die Bindung von Leukozyten an das Endothel möglich, womit sie die Extravasation der Tumorzellen begünstigen. Da ein Mangel an *Fut7* und L-Selektin die Metastasierung in gleichem Ausmaß senkte, ist die Wirkung der Leukozyten über diesen Mechanismus erklärbar – eine direkte Interaktion mit den Tumorzellen scheint nicht essentiell²³³.

Wie deutlich gemacht werden konnte, sind die drei Selektine mit unterschiedlicher Mechanistik bei dem Prozess der Metastasierung beteiligt. E-Selektin-vermittelte Adhäsionen und zum Teil resultierende Rollbewegungen der Tumorzellen entlang des Endothels werden als Voraussetzung für deren Extravasation angenommen. Dagegen entfaltet P-Selektin die Wirkung v. a. über die Bildung von Tumorzell-Thrombozyt-Interaktionen, die zur Generierung von Mikroemboli führt und zum Arrest der Tumorzellen im Gefäßsystem beiträgt. Dabei wird die Wirkung zu einem sehr frühen Zeitpunkt der hämatogenen Metastasierung angenommen. L-Selektin trägt zur Bildung der Mikroemboli bei und fördert die Extravasation der Tumorzellen über die Adhäsion von Leukozyten an endotheliale L-Selektin-Liganden. Die kombinierte Wirkung der Selektine ermöglicht es den Tumorzellen zu überleben und an entfernten Stellen des Organismus zu proliferieren.

In der Abb. 2-9 werden alle potentiellen Bindungsmöglichkeiten zwischen Tumorzellen und Selektinen zusammengefasst.

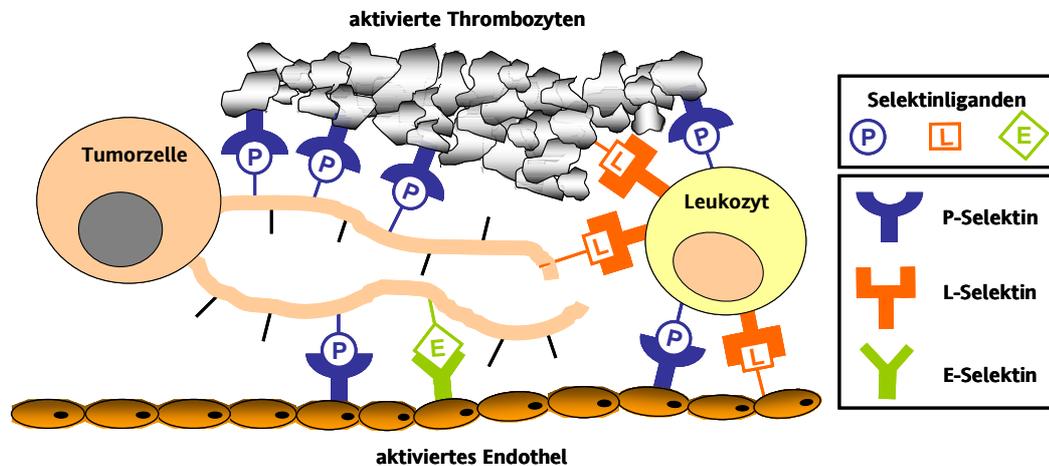


Abb. 2-9: Mögliche Selektin-Tumorzell-Interaktionen. Die Wechselwirkungen der Tumorzellen können mit Thrombozyten oder Endothelzellen über P-Selektin erfolgen. Leukozyten sind in der Lage, via PSGL-1 an die äußere Region von Tumorzell-Thrombozyt-Mikroemboli binden, über L-Selektin mit thrombozytärem PSGL-1 zu interagieren, direkt mit entsprechenden Liganden der Tumorzellen in Wechselwirkung zu treten oder P-Selektin-vermittelt sowie nach Induktion endogener L-Selektin-Liganden an das Endothel zu adhären. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Interaktion der Tumorzellen mit E-Selektin. Die Relevanz der einzelnen Bindungen ist dem Text zu entnehmen. (modifiziert nach Borsig²³⁴)

Den Ausführungen zufolge sind Selektine maßgeblich an der Dissemination von Tumorzellen beteiligt. Ihre Inhibition stellt demnach eine attraktive Möglichkeit dar, blockierend in den Prozess der hämatogenen Metastasierung einzugreifen. Ein effektiver Ansatzpunkt wird in Kapitel 2.7.4 vorgestellt.

2.5.6 Die Beteiligung von VLA-4 und VCAM-1

Das Zelladhäsionsmolekül VCAM-1 wird nicht nur auf Gefäßen, sondern auch auf nicht-vaskulären Zellen exprimiert (s. Kapitel 2.3.1). Zahlreiche *in vivo*-Studien belegen die Erhöhung des VCAM-1-Gehalts im Serum von Krebspatienten bzw. eine erhöhte Expression auf dem Tumorgewebe unterschiedlicher Entität. Beispielhaft sei dies bei Kopf- und Halstumoren¹⁸⁷, Mammakarzinom²³⁵ sowie Magenkarzinom²³⁶ genannt, wobei eine derartige Erhöhung mit der Progression der Erkrankung verbunden ist. Der zugrunde liegende Mechanismus könnte mit dem Schutz der Tumorzellen vor zytotoxischen T-Zellen erklärt werden. Demzufolge fördert die Expression von VCAM-1 die Migration der VLA-4-

positiven T-Zellen, die sich somit vom Tumor entfernen. Die MHC-I-vermittelte Präsentation der Tumorzellantigene gegenüber dem T-Zell-Rezeptor bleibt aus, wodurch eine Aktivierung und Infiltration der T-Zellen in die Tumorzellen unterbunden werden²³⁷.

Andererseits wird die VLA-4/VCAM-1-Interaktion für die Rekrutierung zytotoxischer T-Zellen in intrakranielles Melanomzellgewebe durchaus verantwortlich gemacht, wodurch sich eine Möglichkeit der Therapie mit T-Zellen bei Hirntumoren und/oder -metastasen bieten könnte²³⁸. Daneben existieren Berichte, wonach eine hohe VCAM-1-Expression auf Tumorzellen bestimmter Nierenkarzinome mit einer geringeren Metastasierung und langsamerer Tumorprogression assoziiert ist, was ebenfalls mit einer Rekrutierung von Lymphozyten in Zusammenhang gebracht wird²³⁹.

Die Expression von VCAM-1 ist auch im Rahmen einer Neoangiogenese erhöht. Die Rekrutierung VLA-4-positiver Progenitorzellen, die sich in unterschiedliche Zelltypen differenzieren können, wird verstärkt, womit die VLA-4/VCAM-1-Interaktion Angiogenese und Tumorwachstum fördert²⁴⁰.

Wie in Kapitel 2.2.3 erwähnt, wird VLA-4 nicht ausschließlich auf Leukozyten/Progenitorzellen exprimiert, sondern darüber hinaus auf unterschiedlichen Tumorzellen, wodurch sich eine potentielle Adhäsion dieser Zellen an das Endothel ergibt. Damit kann die Wechselwirkung von Tumorzell-assoziiertem VLA-4 und vaskulär exprimiertem VCAM-1 zu einer Metastasierung beitragen. Neben Osteosarkom- und Rhabdomyosarkomzelllinien²⁴¹ verfügen v. a. maligne Melanomzellen über VLA-4^{134,242}. Dies befähigt zur Adhäsion, was sich in einer erhöhten Transmigration *in vitro*²⁴³ und Lungenmetastasierung im Tiermodell ausdrückt, wobei die VCAM-1-Expression mittels TNF- α -Behandlung oder IL-1 induziert wird²⁴⁴⁻²⁴⁶. Darüber hinaus ist der VLA-4-Gehalt von Melanomzellen primärer Tumore mit dem Verlauf der Erkrankung korrelierbar²¹⁷. Eine erhöhte Expression von VLA-4 ist allerdings nicht immer mit erhöhtem metastatischem Potential verbunden, wie Qian und Kollegen zeigten. Die Transfektion von $\alpha 4$ -cDNA in eine $\alpha 4$ -defiziente Variante von B16-Melanomzellen resultierte in der Bildung von $\alpha 4$ -exprimierenden Klonen, die nach s. c.-Implantation eines Tumors eine erniedrigte Lungenmetastasierung aufwiesen, was die Autoren mit erhöhter homotypischer zellulärer Adhäsion begründeten. Bei i. v.-Injektion dieser Klone bestand allerdings keine veränderte Metastasierungstendenz²⁴⁷. Letztere Methode simuliert die Phase nach erfolgter Intravasation, in der eine VLA-4-Positivität die Adhäsion an das Endothel fördert.

Es soll abschließend erwähnt werden, dass sich das Expressionsmuster von Integrinen und anderen Adhäsionsmolekülen im Lauf der malignen Transformation von Melanomzellen – wie bei vielen Tumorzelltypen – verändert. Normale Melanozyten zeigen v. a. $\alpha 6\beta 1$

und E-Cadherin, während Melanomzellen beispielsweise $\alpha V\beta 3$, $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4), N-Cadherin und CD44 überexprimieren, was ihnen einen invasiven und metastatischen Phänotyp verleiht²⁴⁸.

2.5.6.1 Möglichkeiten der Beeinflussung von VLA-4 und VCAM-1

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit Pterostilben²⁴⁹ sowie mit den Flavonoiden Apigenin und Quercetin²⁵⁰ die Expression von VCAM-1 unterdrückt wird, was eine verminderte Lungenmetastasierung nach sich zieht. Die Targetierung von VLA-4 ist ebenfalls beschrieben. Ajoen, eine Substanz aus dem Knoblauch, verursacht neben apoptotischen Effekten eine Senkung der VLA-4-Expression, was eine verminderte Adhäsion der Melanomzellen am Endothel zur Folge hat²⁵¹.

Daneben ist eine indirekte Beeinflussung von VLA-4 durch die Blockierung des Proteins „melanoma inhibitory activity“ (MIA) möglich. Das von Melanomzellen sezernierte 11 kD-Protein interagiert zum einen mit Komponenten der EZM, z. B. Fibronectin, und besetzt somit die Bindungsstelle für VLA-4, was zum Ablösen der Zellen von EZM-Bestandteilen führt und deren Durchquerung erleichtert. Zum anderen trägt MIA zur Immunsuppression durch die Modulierung von leukozytärem VLA-4 bei, was durch eine entsprechende Antagonisierung mittels Antisense-Oligonukleotiden verhindert werden kann²⁵². Eine direkte Bindung von MIA an VLA-4 der Melanomzellen wird ebenfalls diskutiert, die zur Senkung der Integrinaktivität und der Integrin-vermittelten Signaltransduktion führt, was zu erhöhter Migrationsfähigkeit beiträgt. Die MIA-vermittelte Modulierung von VLA-4 ist demzufolge mit einer höheren Invasivität verbunden. Daher offeriert die Hemmung von MIA eine Behandlungsmöglichkeit des malignen Melanoms²⁵³.

Ein direkter Eingriff in die VLA-4/VCAM-1-Interaktion bietet eine weitere Option der Metastasierungssenkung bei entsprechenden Tumoren, die zusätzlich zur Blockade der Selektinfunktion genutzt werden könnte, wobei entweder das Tumorzell-ständige Integrin oder das endotheliale VCAM-1 blockiert werden kann. Bisher sind Strukturen mit bicyklischen β -Aminosäuren²⁵⁴ und Piperazinyphenylalanin-Derivate²⁵⁵ als VLA-4-Antagonisten sowie der monoklonale VLA-4-Antikörper Natalizumab (Tysabri®) bekannt, die jedoch nicht mit einer Metastasierungssenkung in Verbindung gebracht werden.

Allerdings muss bei dem Einsatz derartiger Inhibitoren gleichzeitig mit einer Blockade von leukozytärem VLA-4 und somit herabgesetzter Immunabwehr gerechnet werden, was wiederum Tumorwachstum und Metastasierung fördern könnte. Dagegen kann sich eine Hemmung der VLA-4-vermittelten endothelialen Adhäsion der Tumorzellen durchaus als

günstig erweisen. Studien zum Nutzen-Risiko-Verhältnis einer VLA-4-Blockade durch entsprechende Antagonisten sind demzufolge unerlässlich.

2.6 Strategien der Selektininhibition

Aufgrund der Involvierung in inflammatorische und metastatische Prozesse stellen Selektine attraktive Zielstrukturen für die pharmazeutische Forschung dar. Da sLe^X das gemeinsame Bindungsepitop aller Selektine ist, war das Tetrasaccharid lange Zeit die Leitstruktur für die Wirkstoffentwicklung, wie von Simanek et al. zusammengefasst. Die Modifikationen umfassten beispielsweise den Ersatz der Sialinsäure durch andere negativ geladene Gruppen oder die Einführung eines zusätzlichen Bindungsepitops in Form einer hydrophoben Seitengruppe²⁵⁶. Trotz der großen Bemühungen war der Erfolg nur mäßig. Weitere Strategien auf der Suche nach Selektininhibitoren sind u. a. die Synthese des sLe^X-Dimer-ähnlichen Pan-Selektin-Antagonists TBC1269 (Bimosiamose)²⁵⁷ und davon abgeleiteter Strukturen²⁵⁸, die Isolierung des Makrolids Efomycin M aus *Streptomyces BS1261*²⁵⁹, die Entwicklung von rekombinantem PSGL-1^{260,261}, eines PSGL-1-Antikörpers²⁶² sowie eines Glykosulfopeptides mit Homologie zum PSGL-1-N-Terminus¹⁹⁰. Daneben kamen die Multimerisierung der sLe^X-Struktur mithilfe von Polymeren²⁶³ und die Präsentation zusätzlicher anionischer funktioneller Gruppen zusammen mit sLe^X auf der Oberfläche von Liposomen²⁶⁴ zum Einsatz. Allerdings dienen diese Anstrengungen hauptsächlich der Therapie entzündlicher Erkrankungen.

Ein Eingriff in die Metastasierung wurde bisher unter Anwendung des COX-2-Hemmers Celecoxib erreicht, der die Expression von sLe^a auf der Oberfläche von Kolonkarzinomzellen senkt, was eine niedrigere Adhäsion an das Endothel sowie eine verminderte Metastasierung in die Leber zur Folge hat²⁶⁵. Das H₂-Antihistaminikum Cimetidin konnte ebenfalls die Metastasierung von Kolonkarzinomzellen unterdrücken, was mit einer Senkung der E-Selektin-Expression des Endothels begründet wurde²⁶⁶. Desweiteren wurden sLe^X-haltige Liposomen beschrieben, die an E-Selektin kompetitive Wirkungen entfalten und somit die Adhäsion von Kolon- und Bronchialkarzinomzellen senken²⁶⁷.

Diese Untersuchungen zielen vor allem auf die Blockierung der sLe^{X/a}/E-Selektin-Interaktion ab. Wie in den vorangegangenen Kapiteln verdeutlicht werden konnte, spielen dagegen in der Frühphase der Metastasierung insbesondere L- und P-Selektin eine entscheidende Rolle. Daher bietet die Inhibition dieser Selektine eine interessante Therapie-

option. Am effektivsten wäre eine Substanz, die sowohl L- als auch P-Selektin-hemmende Aktivität aufweist. Der bekannte Arzneistoff Heparin erfüllt genau diese Bedingungen, steht aus diesem Grund in den letzten Jahren im Fokus der Tumorforschung und wird in den folgenden Kapiteln charakterisiert.

2.7 Der Einfluss von Heparin auf den Verlauf von Krebs-erkrankungen

2.7.1 Struktur, Vorkommen und klinischer Einsatz bei onkologischen Patienten

Heparin ist ein polydisperses Glykosaminoglykan-Gemisch, in dem zehn verschiedene Monosaccharide vorkommen können. Die mit 75-90% wichtigste Disaccharideinheit besteht aus Iduronsäure und einem disulfatierten Glucosamin (Abb. 2-10). Die übrigen Disaccharide unterscheiden sich in ihrem Sulfatierungsgrad und -muster; außerdem findet man solche mit Glucuronsäure und *N*-Acetylglucosamin.

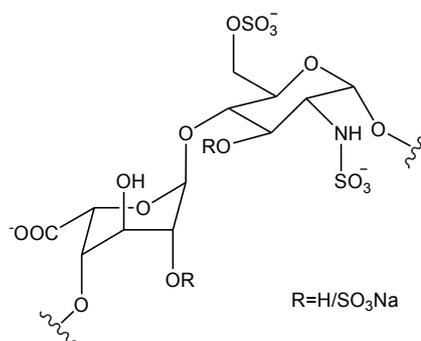


Abb. 2-10: Heparin. Dargestellt ist die wichtigste Disaccharideinheit aus Iduronsäure und einem disulfatierten Glucosamin (R=H). Die Iduronsäure kann an der Position 2-O, das Glucosamin an Position 3-O sulfatiert sein.

Im Organismus werden bedeutende Heparinkonzentrationen in der Lunge, Leber, Darmmukosa, Thymus, Milz und Herz erreicht. Die Lympheflüssigkeit, Blutplasma und das Gefäßendothel enthalten ebenfalls Heparin. Das Heparin-Proteoglykan befindet sich in den Mastzellen und basophilen Granulozyten; unter dem Einfluss von Proteinase und

Endoglykosidasen wird Heparin freigesetzt. Die physiologische Bedeutung der antikoagulatorischen Aktivität des endogenen Heparins ist bislang unklar.

Pharmakologisch wird zwischen unfraktionierten Heparinen (UFH; Molekulargewicht etwa 5-30 kD, mittleres Molekulargewicht 15 kD entspr. 50 Monomere) und niedermolekularen Heparinen („low molecular weight heparin“, LMWH; Molekulargewicht etwa 4-6 kD, mittleres Molekulargewicht 5 kD) unterschieden.

Die Anwendung besteht in der antikoagulatorischen Wirkung, indem es in die plasmatische Blutgerinnung eingreift. Dabei bindet es über seine „antithrombin binding site“, eine Pentasaccharidsequenz, an Antithrombin (AT), wodurch die Gerinnungshemmung über die AT-vermittelte Inhibition von aktivierten Gerinnungsfaktoren (z. B. Faktor Xa und Thrombin) aufgrund der Heparin-induzierten Konformationsänderung des AT beschleunigt wird. Während für die Inaktivierung von Faktor Xa bereits das Pentasaccharid allein ausreicht, ist für die von Thrombin eine Wechselwirkung des Heparins mit AT und Thrombin selbst notwendig, was durch eine Kettenlänge von mindestens 18 Monosacchariden realisiert wird.

Zusätzlich wird eine Beeinflussung des Endothels angenommen, wobei Heparin einerseits dessen elektronegatives Potential und somit seine athrombogenen Eigenschaften verstärkt und andererseits zur Freisetzung des endothelial gebundenen „tissue factor pathway inhibitors“ (TFPI) beiträgt, der durch Bindung an Faktor Xa blockierend in die Gerinnungskaskade eingreift.

Onkologische Patienten haben ein erhöhtes Risiko, eine VTE zu erleiden und an den Folgen einer Pulmonalembolie zu versterben (s. Kapitel 2.5.2). Ungefähr 15% aller Tumorpatienten entwickeln während des Verlaufs ihrer Erkrankung eine Venenthrombose, was wesentlich von der Tumorentität und dem Krankheitsstadium beeinflusst wird. Patienten mit Metastasen haben ein 15fach höheres Thromboserisiko als Patienten in frühen Erkrankungsstadien²⁶⁸. Das Thromboserisiko wird zusätzlich durch Operationen, Chemotherapie, zentralvenöse Verweilkatheter, Immobilisation, Infektionen und Malnutrition erhöht.

Die VTE ist die zweithäufigste Todesursache bei Krebspatienten²⁶⁹. Das Risiko von Tumorpatienten mit VTE, innerhalb des nächsten Jahres zu versterben, ist doppelt so hoch wie bei Tumorpatienten ohne Thrombose²⁷⁰. Aus diesem Grund sind Thromboseprophylaxe und -therapie unerlässlich.

Für viele Jahre galt UFH als Standard, während sich später abzeichnete, dass LMWH mindestens genauso sicher und effektiv ist²⁷¹. Traditionell erfolgt die Therapie einer VTE

initial mit Heparin, gefolgt von einer Langzeitadministration oraler Antikoagulantien zur Vermeidung eines Rezidivs. Allerdings erwiesen sich diese in dem Zusammenhang als weniger effektiv²⁷² und weniger sicher, da gehäuft Blutungen auftraten²⁷³. Die aktuellen Richtlinien wurden kürzlich von Brose & Lee zusammenfassend dargestellt. Demnach wird eine Prophylaxe mit LMWHs bei hospitalisierten Patienten empfohlen, solange keine absoluten Kontraindikationen vorliegen. Eine Prophylaxe ambulant behandelter Patienten ist nicht nötig, ausgenommen bei jenen, die eine Thalidomid- oder Lenalidomid-basierte Chemotherapie erhalten. Die Behandlung der VTE sollte mit LMWH für mindestens drei bis sechs Monate durchgeführt werden, wobei die Therapie so lange verlängert werden sollte, wie eine aktive Krebserkrankung vorliegt²⁷⁴.

2.7.2 Die Assoziation von Heparin-gabe und gesenkter Mortalität bei Krebspatienten

Die Prophylaxe und Therapie thromboembolischer Ereignisse führt nicht nur zu einer Vermeidung des Auftretens tödlich verlaufender Embolien, sondern steht interessanterweise im Zusammenhang mit antineoplastischen/antimetastatischen Effekten, die sich in einer Lebenszeitverlängerung onkologischer Patienten äußert.

Es zeichnete sich bereits in den 60er Jahren ab, dass die Therapie mit Vitamin-K-Antagonisten mit positiven Effekten hinsichtlich der Progression der Krebserkrankung verbunden ist²⁷⁵. Der erste klinische Beweis, wonach Antikoagulantien antineoplastische Effekte aufweisen, wurde mittels einer prospektiven, randomisierten Studie erbracht. Es ergab sich hierbei, dass Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom eine geringere Sterblichkeit zeigten, wenn sie Warfarin erhielten²⁷⁶. Allerdings konnte diese Beobachtung in späteren randomisierten klinischen Studien bei Patienten mit anderen Krebserkrankungen nicht bestätigt werden²⁷⁷.

Seitdem konzentrieren sich viele Untersuchungen auf die Bedeutung von UFH, später LMWH, für den Verlauf von Krebserkrankungen. Einige retrospektive Untersuchungen ermittelten den positiven Effekt einer perioperativen VTE-Prophylaxe mit UFH, wobei sowohl die 3-Jahresmortalität als auch die Mortalität aufgrund der Metastasierung im Vergleich zu Patienten ohne Prophylaxe signifikant abnahmen²⁷⁸. In einer randomisierten prospektiven Multicenter-Studie an Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom, die unter Chemotherapie standen und zum Teil zeitgleich UFH erhielten, ergab sich ein besseres Ansprechen auf die Chemotherapie in der UFH-Gruppe. Weiterhin war die mittlere Überle-

bensdauer durch die UFH-Gabe erhöht. Allerdings war der Unterschied nur in einer Patienten-Subgruppe mit limitierter Erkrankung signifikant²⁷⁹. Eine systematische Analyse aller klinischer Studien an Krebspatienten ohne VTE, die UFH mit Placebo/keine Behandlung verglichen, ermittelte jedoch keine überzeugenden Beweise von positiven oder negativen UFH-Effekten auf das Überleben²⁸⁰.

Der Einfluss von UFH auf die Prognose von Krebserkrankungen ist demnach fragwürdig, steht aber im deutlichen Gegensatz zu LMWH. Zwei Metaanalysen aller klinischer Untersuchungen, bei denen die Effektivität von LMWH gegenüber UFH bei der initialen Behandlung der VTE geprüft wurde, verzeichneten eine Reduktion der Mortalität bei den Patienten, die LMWH erhielten^{281,282}. Das Benefit war bei onkologischen Patienten besonders deutlich ausgeprägt und konnte nicht durch eine Senkung des Auftretens tödlicher Pulmonalembolien oder Blutungsereignisse erklärt werden. Diese Tatsache sowie die Vorteile der LMWH-Administration und die Möglichkeit einer sicheren Langzeittherapie führten dazu, die Untersuchungen in hauptsächlich prospektiven, randomisierten klinischen Studien fortzusetzen, wobei teilweise das Überleben als primärer Endpunkt definiert wurde²⁸³⁻²⁸⁷. Einige Ergebnisse sind in Tab. 2-1 zusammengefasst.

Tab. 2-1: Der Einfluss von LMWHs auf die Progression von Krebserkrankungen

Referenz	Art der Erkrankung	Behandlungsregime	Ergebnisse
Kakkar et al. ²⁸⁴	Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren unterschiedlichen Typs ohne VTE	5000 I. E./d Dalteparin s. c. vs. Placebo (+ Standardtherapie, 1 Jahr)	Keine signifikante Verbesserung der 1-Jahresmortalität; höhere Überlebensrate nach 2 und 3 Jahren in einer Subgruppe mit besserer Prognose (78% vs. 55% und 60% vs. 36%)
Altinbas et al. ²⁸⁵	Kleinzelliges Bronchialkarzinom (unterschiedliches Stadium) ohne VTE	Chemotherapie + 5000 I. E./d Dalteparin s. c. vs. Chemotherapie (18 Wochen)	Ansprechen auf Chemotherapie: 69,2% vs. 42,5%; mittlerer progressionsfreier Zeitraum: 10,0 Monate vs. 6,0 Monate; mittleres Gesamtüberleben: 13,0 Monate vs. 8,0 Monate
Klerk et al. ²⁸⁶	Patienten mit metastasierten oder lokal fortgeschrittenen soliden Tumoren ohne VTE	7600-15200 I. E./d Nadroparin s. c. (in 2 Einzeldosen) in den ersten 2 Wochen, im Anschluss 3800-7600 I. E./d für 4 Wochen (in Abhängigkeit vom KG) vs. Placebo (6 Wochen)	Mittleres Gesamtüberleben: 8,0 Monate vs. 6,6 Monate; in Patientensubgruppe mit einer Lebenserwartung von ≥ 6 Monaten bei Studienbeginn: mittleres Überleben 15,4 Monate vs. 9,4 Monate

Referenz	Art der Erkrankung	Behandlungsregime	Ergebnisse
Lee et al. ²⁸⁷	Patienten mit soliden Tumoren und VTE	200 I. E./kg/d Dalteparin s. c. im ersten Monat, im Anschluss 150 I. E./kg/d für 5 Monate vs. 200 I. E./kg/d Dalteparin s. c. in der ersten Woche, anschließend Cumarinderivat, INR 2,0-3,0 (6 Monate)	Mortalitätswahrscheinlichkeit nach 12 Monaten bei Patienten ohne Metastasen: 20% vs. 36% Kein Unterschied bei Patienten mit bestehenden Metastasen

I. E. Internationale Einheiten (anti-Faktor Xa); INR, „international normalized ratio“; KG, Körpergewicht; s. c., subkutan; vs., versus; VTE, venöse Thromboembolie.

Die Resultate veranschaulichen die positiven Effekte von LMWHs auf den Verlauf der Erkrankung, wobei besonders Patienten mit besserer Prognose zu Studienbeginn einen Nutzen ziehen. Es wird auch deutlich, dass die Studien sehr heterogen aufgebaut sind und nach weiteren Ergebnissen verlangen, um evtl. die Tumortypen sowie Krankheitsstadien zu identifizieren, die am besten von einer Heparin-gabe profitieren. Desweiteren sind Untersuchungen erforderlich, die die optimale Dosierung und Behandlungsdauer festlegen.

Darüber hinaus werden ähnliche Ergebnisse auch in einer Vielzahl von Tiermodellen erzielt. Diese sind umfassend von Niers et al. zusammengefasst, wobei deutlich wird, dass Heparin eher die Bildung von Metastasen beeinflusst als das Wachstum des Primärtumors²⁸⁸. Die verantwortlichen Mechanismen werden derzeit intensiv untersucht. Zieht man in Betracht, dass die Heparin-gabe nur für einen bestimmten Zeitraum erfolgt, der Überlebensvorteil jedoch auch nach längerer Zeit bestehen bleibt, kann dies nicht in erster Linie mit der Antikoagulation erklärt werden^{283,286}. Diese Hypothese wird auch durch den Einsatz chemisch modifizierter Heparine bekräftigt, die trotz fehlender antikoagulatorischer Aktivität metastasierungssenkende Eigenschaften aufweisen²⁸⁹⁻²⁹⁵. Im Gegensatz dazu ist das antikoagulatorisch wirksame synthetische Pentasaccharid Fondaparinux nicht in der Lage, einen metastasierungssenkenden Effekt zu erzielen²⁹⁶.

Demnach liegen (zusätzlich) Wirkprinzipien jenseits der Antikoagulation zugrunde. Einen potentiellen Angriffspunkt bieten Selektine, die maßgeblich im Prozess der Metastasierung beteiligt sind. Heparin bindet an L- und P-Selektin (s. Kapitel 2.7.3) und entfaltet durch den Eingriff in die Selektin-vermittelte Metastasierung antimetastatisches Potential, was in Kapitel 2.7.4 erörtert werden soll.

2.7.3 Die Wechselwirkung von Heparin mit L- und P-Selektin

Bereits im Jahr 1989 konnte von Skinner et al. gezeigt werden, dass P-Selektin eine Heparinbindungsfähigkeit aufweist, was durch andere sulfatierte Glykane wie Fucoidan und Dextransulfat inhibiert werden kann²⁹⁷. Kurz darauf wurde demonstriert, dass die Bindung von Neutrophilen an P-Selektin durch Heparin, Fucoidan und Dextransulfat blockierbar ist, was die Autoren vermuten ließ, dass die Bindungsstellen des P-Selektins für sulfatierte Glykane und für Neutrophile identisch sind oder in großer räumlicher Nähe zueinander liegen²⁹⁸. Mit der Aufklärung des PSGL-1 konnten die strukturellen Voraussetzungen der P-Selektin-Bindung später bestätigt werden (s. Kapitel 2.1.2.3).

1993 wurde schließlich bekannt, dass Heparintetrasaccharide, die nicht mehr antikoagulatorisch wirken, P- und L-Selektin, nicht dagegen E-Selektin binden können²⁹⁹. Eine L-Selektin-Bindungsfähigkeit endothelialer Heparin-ähnlicher Verbindungen konnte von Norgard-Sumnicht et al. demonstriert werden³⁰⁰, die später als Heparansulfat-Proteoglykane identifiziert wurden³⁰¹. König und Kollegen zeigten schließlich, dass UFHs bei 12-50fach niedrigerer Konzentration die P- und L-Selektin-Wechselwirkung mit sLe^x bzw. PSGL-1-positiven Zellen hemmen als für eine antikoagulatorische Wirkung *in vivo* vorgeschlagen wird. Zusätzlich stellten sie fest, dass LMWHs in diesem Assay ein schlechteres Inhibierungspotential aufweisen. Weiterhin konnten Heparansulfate mit einer P- und L-Selektin-Bindungsfähigkeit in Zusammenhang gebracht werden, was den Schluss zuließ, diese Substanzen und Heparine, besonders UFHs, als therapeutische Agentien bei akuten und chronischen Zuständen einzusetzen, in denen P- und L-Selektin involviert sind³⁰². Die Kettenlänge, damit einhergehend das Molekulargewicht, ist demnach ein wichtiger Parameter, der die Selektinbindung der Heparine kontrolliert.

Daneben hat die Ladung einen Einfluss, wie Xie und Mitarbeiter zeigen konnten. Die Reduktion der Carboxylgruppe („carboxyl-reduced heparin“, CR-Heparin) führt zu einem Verlust der P- und L-Selektin-Blockade, während die Einführung einer Sulfatgruppe an die durch die Reduktion entstandene Hydroxylgruppe („carboxyl-reduced sulfated heparin“, CRS-Heparin) die Aktivität dieses modifizierten Heparins wiederherstellt. Im Vergleich zu unmodifiziertem Heparin weist CRS-Heparin keine antikoagulatorische Wirkung auf, wobei die Selektinbindung allerdings bestehen bleibt³⁰³. Die Trennung von antikoagulatorischer und P-Selektin-inhibierender Aktivität kann auch durch eine Periodatoxidation und Borhydridreduktion des Heparins („reduced oxyheparin“, RO-Heparin) erreicht werden³⁰⁴. Wang et al. und Wei et al. fokussierten schließlich auf das Sulfatierungsmuster. Die Sulfatgruppe an C-Atom 6 des Glucosamins ist demnach essentiell für eine P-Selektin-Bin-

dung, während eine 2-O-, 3-O-Desulfatierung die Selektinbindungsfähigkeit erhält, die antikoagulatorische Aktivität jedoch stark abnimmt^{305,306}.

Derartige Substanzen stellen interessante Wirkstoffe dar, da durch ihren Einsatz ein Eingriff in Selektin-vermittelte pathologische Prozesse unter Umgehung Heparin-bedingter Nebenwirkungen möglich wird. Dies verdeutlicht auch die Notwendigkeit der Bestimmung von Struktur-Wirkungsbeziehungen von Heparinen und sulfatierten Glykanen hinsichtlich ihrer Selektinbindung. Da das natürlich vorkommende Heparin ein komplexes Gemisch ist, sind detaillierte Aussagen dazu schwierig. Semisynthetische, chemisch definierte sulfatierte Polysaccharide bieten dagegen diese Möglichkeit. Es wurden bereits vier Verbindungen aus der Klasse sulfatierter Glucane im Vergleich zu UFH und LMWH hinsichtlich ihrer P-Selektin-Inhibition getestet³⁰⁷. Die limitierte Anzahl der Substanzen lässt jedoch umfassende strukturelle Diskussionen nicht zu.

2.7.4 Die Selektinblockade durch Heparin als Ursache der Metastasierungssenkung

Heparin hemmt im Mausmodell sowohl die Bildung von Tumorzell-Thrombozyt-Mikroemboli als auch die Metastasierungsrate, wobei die Inhibition genauso effektiv wie ein Defizit an P-Selektin ist. Eine Kombination aus P-Selektin-Mangel und Heparin-gabe hat keine weitere Senkung der Metastasierung zur Folge, was zu dem Schluss führt, dass beide Methoden auf denselben Schritt in der metastatischen Kaskade wirken. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die etwa fünf Stunden anhaltende Blockade der Thrombozyt-Tumorzell-Interaktion die Bildung von Metastasen auf lange Sicht reduziert. Sechs Wochen nach einmaliger i. v.-Heparin-injektion, die 30 Minuten vor der i. v.-Injektion von Kolonkarzinomzellen erfolgte, zeigten die untersuchten Mäuse kaum metastatische Herde in der Lunge im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Als weiterer positiver Effekt wurde festgestellt, dass humanes P-Selektin gegen Heparin empfindlicher ist als murines P-Selektin – eine signifikante Inhibition trat im klinisch akzeptablen Konzentrationsbereich ein³⁰⁸. P- und L-Selektin-defiziente Mäuse (PL^{-/-}) zeigen im Vergleich zu P^{-/-}-Mäusen eine weitere Abnahme der Anzahl an Lungenmetastasen, womit der Synergismus beider Selektine belegt werden konnte²²³ (s. Kapitel 2.5.5).

Ein alleiniges L-Selektin-Defizit bewirkt ebenfalls eine Metastasierungssenkung, wobei die Bildung der Mikroemboli jedoch nicht beeinflusst wird^{223,233}. Wird L^{-/-}-Mäusen Heparin 30 Minuten vor der Tumorzellinjektion verabreicht, ist im Gegensatz zu P^{-/-}-Mäusen eine

weitere Reduktion der Metastasierung zu verzeichnen. Daher postulierten die Autoren, dass Heparin nicht durch eine L-Selektin-Blockade, sondern wahrscheinlich über die P-Selektin-Hemmung die entsprechende Wirkung erzielt. Desweiteren konnte somit verdeutlicht werden, dass der L-Selektin-vermittelte Beitrag der Leukozyten unabhängig von der P-Selektin-vermittelten Tumorzell-Thrombozyt-Aggregation ist²²³.

Mit der Aufklärung des Wirkmechanismus von Leukozyten bei der Förderung der Metastasierung wurde deutlich, dass L-Selektin zu einem späteren Zeitpunkt als P-Selektin agiert (s. Kapitel 2.5.5). Da Heparin an L-Selektin bindet (s. Kapitel 2.7.3), ist eine Beeinflussung der Tumorzell dissemination dennoch möglich. Im Gegensatz zur frühen Heparinadministration (30 Minuten vor Tumorzellinjektion) tritt eine Hemmung der L-Selektin-vermittelten Metastasierung auf, wenn Heparin innerhalb der ersten sechs bis 18 Stunden nach Tumorzellinjektion gespritzt wird. Dies ist besonders von klinischer Relevanz, da sich die Tumorzellen zum Zeitpunkt der Heparinabgabe bereits im Blutgefäßsystem befinden, wie es auch bei Krebspatienten im fortgeschrittenen Stadium der Fall ist²³³.

Da eine Heparininjektion in PL^{-/-}-Mäusen keinen weiteren Effekt zeigt, wurde angenommen, dass keine zusätzlichen biologischen Funktionen des Heparins einen aktiven Beitrag bei der Metastasierungssenkung leisten.

Allerdings ist festzuhalten, dass diese Schlussfolgerung für die verwendeten Karzinomzelllinien zutrifft, die aufgrund ihrer Ligandausstattung deutlich Selektin-abhängig metastasieren. Heparin vermittelt neben der Selektinblockade durchaus weitere Wirkmechanismen, wie im folgenden Kapitel vorgestellt wird.

2.7.5 Selektin-unabhängige Heparineffekte

Neben dem Eingriff in L- und P-Selektin-abhängige Metastasierungsprozesse erzielt Heparin weitere Effekte, die sich günstig auf den Verlauf von Krebserkrankungen auswirken. Einige Mechanismen werden in Tab. 2-2 zusammengefasst.

Tab. 2-2: Selektin-unabhängige Heparineffekte

Referenz	Hintergrund	Heparineffekt
Rickles ³⁰⁹	Thrombin beeinflusst Metastasierung und Angiogenese über koagulationsabhängige (Fibrinbildung) und -unabhängige (PAR-1-vermittelte Signalkaskaden) Mechanismen ^b .	Heparin inhibiert Thrombinbildung und/oder -aktivität, was eine Beeinflussung des Tumorgeschehens zur Folge hat. Die Hemmung der Thrombinbildung ist auch indirekt durch Stimulierung der TFPI-Freisetzung möglich (s. u.).
Mousa & Mohamed ³¹⁰	Der TF/VIIa-Komplex fördert sowohl die initialen Reaktionen der Blutgerinnung über die Aktivierung der Xa-katalysierten Thrombinbildung als auch die Angiogenese. Die Inhibition beider Prozesse ist durch endothelial freigesetzten TFPI möglich.	LMWH Tinzaparin stimuliert die Freisetzung von TFPI und hemmt auf diesem Weg die Angiogenese. TFPI inhibiert die Blutgerinnung über Bindung an Xa und anschließender Wechselwirkung mit TF/VIIa. Die Angiogenese wird durch Tinzaparin Xa-unabhängig gesenkt.
Jayson & Gallagher ³¹¹ Chen et al. ³¹²	Der Wachstumsfaktor bFGF steuert Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen. Eine erhöhte Expression ist bei Tumorzellen zu finden. Die Wirkung des Signalkomplexes aus FGF und FGFR ist abhängig von Heparansulfat.	Heparinoligosaccharide inhibieren bFGF-induziertes Wachstum und Migration von Kolonkarzinomzellen ³¹¹ . N-desulfatiertes Heparin ohne antikoagulatorische Wirkung senkt Magenkarzinom-Metastasierung und Angiogenese durch die Inhibition der bFGF-Expression ³¹² .
Edovitsky et al. ³¹³ Vlodavsky et al. ³¹⁴ Hostettler et al. ²⁹⁵	Heparanase spaltet HS-Gruppen von HSPGs, degradiert somit Teile der EZM, setzt HS-gebundene angiogene Faktoren frei und ist in Signalkaskaden involviert. Heparanase ist in normalen Geweben selten, wird von Tumorzellen überexprimiert, was mit erhöhter Invasivität und Metastasierung korreliert. Erhöhte Heparanase-Level in Plasma/Urin sind u. a. bei Krebspatienten zu finden.	UFH, LMWH und chemisch modifizierte Heparine ohne antikoagulatorische Aktivität und z. T. ohne Selektin-Spezifität ²⁹⁵ inhibieren Heparanase und senken die experimentelle Metastasierung.
Angelini et al. ^{315,316}	Überexpression von Pgp/MRP1 in Tumorzellen führt zur Multidrug-Resistenz im Rahmen einer Zytostatikatherapie.	Behandlung von Doxorubicin-resistenten Zellen mit UFH und Doxorubicin führt zu erhöhter Akkumulation des Zytostatikums und somit gesteigerter Zytotoxizität. Ein potentieller Einsatz von Heparin als Chemosensitizer wird vorgeschlagen.

(b)FGF, „(basic) fibroblast growth factor“; EZM, extrazelluläre Matrix; FGFR, „fibroblast growth factor receptor“; HS, Heparansulfat; HSPG, Heparansulfat-Proteoglykan; LMWH, „low molecular weight heparin“; MRP1, „multidrug resistance protein 1“; PAR-1, „protease activated receptor-1“; Pgp, P-Glykoprotein; TF, „tissue factor“; TFPI, „tissue factor pathway inhibitor“; UFH, unfraktioniertes Heparin.

b Die Beteiligung von Thrombin bei der TCIPA ist im Kapitel 2.5.2 beschrieben. Darüber hinaus kann eine Überlappung mit anderen Prozessen angenommen werden, z. B. Stimulierung der P-Selektin-Expression (s. Kapitel 2.1.1.3).

Die Ausführungen machen deutlich, dass der Einsatz von Heparin bei onkologischen Patienten mit Vorteilen verbunden ist, die nicht nur aus Prophylaxe und Therapie thromboembolischer Ereignisse resultieren. Darüber hinaus senkt Heparin über andere Wege die Mortalität bei Krebserkrankungen, die meist Folge einer Metastasierung ist. Es kommen viele potentielle, u. U. parallel ablaufende Mechanismen in Frage.

Im Gegensatz zur Chemotherapie, bei der das Target die Krebszelle selbst ist, beeinflusst Heparin hauptsächlich Strukturen außerhalb der Zelle. Das könnte erklären, warum die positive Wirkung auf Tumorpatienten ein generelles Phänomen und nicht an einen bestimmten Tumortyp gebunden ist.

2.8 Aufgaben- und Problemstellung

Wie verdeutlicht werden konnte, haben Adhäsionsmoleküle neben ihrer Funktion im inflammatorischen Geschehen einen bedeutenden Anteil am Metastasierungsprozess. Dabei kommt zu einem frühen Zeitpunkt besonders P-Selektin eine entscheidende Rolle zu. Um dessen Wirkmechanismus zu identifizieren, soll das Adhäsionsverhalten unterschiedlicher Tumorzellen *in vitro* in Anlehnung an physiologische Bedingungen simuliert werden, wobei neben der Bindungsfähigkeit an rekombinantem P-Selektin auch die Rolle von Thrombozyten untersucht werden soll.

Eine Blockade von P-Selektin stellt eine vielversprechende Option dar, in pathologische Prozesse einzugreifen. Heparin weist P- und L-Selektin-inhibierende Eigenschaften auf, die teilweise mit einer Metastasierungssenkung in Verbindung gebracht werden. Aufgrund seiner komplexen Zusammensetzung erlaubt Heparin keine exakten Aussagen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen. Im Gegensatz dazu bieten semisynthetische Derivate die Möglichkeit struktureller Diskussionen. Aus diesem Grund sollen Heparine und drei Klassen semisynthetischer Glucansulfate mit definierter chemischer Zusammensetzung hinsichtlich des Einflusses von Molekulargewicht, Sulfatierungsgrad und Kohlenhydratgerüst auf die P-Selektin-Inhibition untersucht werden.

Neben Selektinen sind Integrine und deren Liganden aus der Ig-Superfamilie im Metastasierungsgeschehen beteiligt. Die Expression entsprechender Adhäsionsmoleküle befähigt Tumorzellen, zusätzliche Bindungswege zu nutzen. Daher soll im weiteren Verlauf der Arbeit der Fokus auf die VLA-4/VCAM-1-Wechselwirkung gelegt werden und dem

Verständnis der Metastasierung von Melanomzellen dienen, die über die Beteiligung von P- und L-Selektin hinausgeht.

Neben der Selektininhibition besitzt Heparin vielfältige biologische Aktivitäten, die mit einer Metastasierungssenkung assoziiert sind. Möglicherweise erzielt Heparin über weitere, bislang unbekannte Mechanismen einen Eingriff in die Tumorzelladhäsion. Um diesen Aspekt zu berücksichtigen, soll der Einfluss von Heparin auf die VLA-4/VCAM-1-Interaktion charakterisiert werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse sollen dazu beitragen, die Mechanismen der Tumorzelladhäsion im Prozess der Metastasierung aufzuklären und Interventionsmöglichkeiten vorzuschlagen, wobei besonderes Augenmerk auf Heparin und strukturell verwandte Substanzen gelegt wird.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage Sartorius Basic BA210S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
AxioCam MRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
CASY [®] 1 Model TT Cell Counter + Analyser System	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Cryo 1°C Freezing Container	Nalge Nunc International, Hereford, U.K.
FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FORMA Universal-Wassermantel-Inkubator 3121	ThermoQuest Analytische Systeme GmbH, Egelsbach, Deutschland
Langmuir-Filmwaage	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland Kraftaufnehmer und Steuerung von Riegler & Kirstein GmbH, Potsdam, Deutschland
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, Deutschland
Minishaker MS1	IKA [®] Works da Brasil Ltda, Taquara, Brasilien
pH-Meter Φ 720	Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA
POLARStar Galaxy	BMG Lab Technologies GmbH, Offenburg, Deutschland

Pumpe ISM 796	Ismatec SA, Labortechnik-Analytik, Glattbrugg-Zürich, Schweiz
Schüttler KS-15 B	Johanna Otto GmbH, Hechingen, Deutschland
Trockenschrank T 5042	Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultraschallbad Bandelin Sonorex RK 102 H	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Videokamera CSC-795 (PAL)	Pacific Corporation, Tokio, Japan
Wasserbad TW 12	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach/Schwarzwald, Deutschland
Zentrifuge 5417C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Avanti™ J-25	Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA
Zentrifuge mini Spin	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Universal 320 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

3.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ammoniaklösung 26%	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Bacillof® AF	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin, Fraktion V, ≥96%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Calcein-AM	Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CASY®ton Lösung	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Chloroform	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland

Citronensäure, wasserfrei	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Cyanurchlorid	ACROS Organics, Geel, Belgien
1,2-Distearyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA
D-MEM („low glucose“) D5546	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
D-MEM („high glucose“) D6546	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid	ACROS Organics, Geel, Belgien
EDTA-Lösung (0,02%) E8008	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
E-Selektin-Fc-Chimären (rekombinant, human)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
E-Selektin-Fc-Chimären (rekombinant, murin)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Ethanol 96% (V/V), technisch, vergällt mit PE	Hofmann Chemie Import-Export GmbH, Hamburg, Deutschland
FACS Clean™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Rinse™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fetales Kälberserum F7524	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
D-(+)-Glucose-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin 200 mM G7513	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
HBSS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
HEPES (99,5%)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hoechst 33342-Trihydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

L-Selektin-Fc-Chimären (rekombinant, human)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
L-Selektin-Fc-Chimären (rekombinant, murin)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mangan(II)-chlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MEM- α + Ribonukleoside + Desoxyribonukleoside	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MEM nicht-essentielle Aminosäuren 10 mM (100x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Monochlorodimethyloctadecylsilan	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Natriumazid	Janssen Chimica, Beerse, Belgien
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	ACROS Organics, Geel, Belgien
Penicillin-Streptomycin-Lösung P0781	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
P-Selektin-Fc-Chimären (rekombinant, human)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
P-Selektin-Fc-Chimären (rekombinant, murin)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
RPMI-1640-Medium R8758	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Schwefelsäure 95-97%	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Sepharose [®] 4B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
sLe ^X Lac1	Synthese: Arbeitsgruppe um Prof. em. Dr. R. R. Schmidt, Universität Konstanz, Deutschland

TNF- α	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
TRAP-14 (Trifluoracetat)	Bachem Distribution Services GmbH, Weil am Rhein, Deutschland
Trypsin-EDTA-Lösung (0,25%) T4049	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin-EDTA-Lösung (1x) T3924	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
VCAM-1-Fc-Chimären (7d, rekombinant, murin)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland

3.1.3 Antikörper

Antikörper	Hersteller
anti-Human-CD62P (P-Selektin) Klon: AK-4, Isotyp: Maus IgG _{1,κ}	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
anti-Human-CD62P (P-Selektin) FITC-konjugiert, 100 tests Klon: AK-4, Isotyp: Maus IgG _{1,κ}	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
anti-Human-CD162 (PSGL-1) Klon: KPL-1, Isotyp: Maus IgG _{1,κ}	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
anti-Human-IgG (Fc-spezifisch) FITC-konjugiert (isoliert aus der Ziege)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
anti-Maus-CD49d (Integrin α 4-Kette) Klon: 9C10 (MFR4.B), Isotyp: Ratte (Lewis) IgG _{2a,κ}	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
anti-Maus-CD62P (P-Selektin) Klon: RB40.34, Isotyp: Ratte (Lewis) IgG _{1,λ}	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
anti-Maus-CD106 (VCAM-1) Klon: M/K-2, Isotyp: Ratte (Lewis) IgG _{1,κ}	Chemicon Europe/Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
anti-Maus-CD162 (PSGL-1) Klon: 4RA10, Isotyp: Ratte (Lewis) IgG _{1,κ}	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

anti-Maus-IgG ₁ FITC-konjugiert Klon: A85-1 Isotyp: Ratte (Lewis) IgG _{1,κ}	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
anti-Ratte-IgG ₁ FITC-konjugiert Klon: RG11/39.4 Isotyp: Maus (SJL) IgG _{2a,κ}	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
anti-Ratte-IgG _{2a} FITC-konjugiert Klon: RG7/1.30 Isotyp: Maus (SJL) IgG _{2b,κ}	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

3.1.4 Testsubstanzen

Substanz	Hersteller
Curdiansulfate CurS-1 bis CurS-5	Synthese: Arbeitsgruppe Prof. Dr. S. Alban, Christian-Albrechts-Universität Kiel, Deutsch- land
Enoxaparin-Natrium (Clexane® 20 mg/0,2 ml)	Sanofi-Aventis GmbH, Frankfurt/M., Deutschland
Fucoidan (niedermolekular)	Kraeber GmbH & Co., Ellerbek, Deutschland
Heparin (FITC-gelabelt, UFH-FITC)	Synthese: Arbeitsgruppe Dr. B. Casu, Dr. A. Naggi, G. Ronzoni-Institut für Chemische und Biochemische Forschung, Mailand, Itali- en
Heparin Liquemin® N 5000 (5000 I.E./0,5 ml)	Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Heparin-Natrium 5000 ratiopharm® (5000 I.E./0,2 ml)	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Heparin LMWH	Novartis Pharma, Nürnberg, Deutschland
Heparin MMWH	Novartis Pharma, Nürnberg, Deutschland
Heparin UFH 1	Novartis Pharma, Nürnberg, Deutschland
Heparin VLMWH	Novartis Pharma, Nürnberg, Deutschland
Phycarinsulfate PhyS-1 bis PhyS-6	Synthese: Arbeitsgruppe Prof. Dr. S. Alban, Christian-Albrechts-Universität Kiel, Deutsch- land

Pullulansulfate PulS-1 bis PulS-4

Synthese: Arbeitsgruppe Prof. Dr. S. Alban,
Christian-Albrechts-Universität Kiel, Deutschland

3.1.5 Sonstiges

Produkt	Hersteller
Alkoholtupfer	B. Braun Petzold GmbH, Melsungen, Deutschland
CASY® cups	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Cellstar® Kulturflasche 25 cm ² , mit Filter	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar® Kulturflasche 75 cm ² , mit Filter	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar® Kulturflasche 175 cm ² , mit Filter	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar® TC-Platte 6-Well, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar® TC-Platte 24-Well, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar® Zentrifugenröhrchen, PP-Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar® Zentrifugenröhrchen, PP-Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläser, rund, Durchmesser 18 mm, Stärke 3 (0,28-0,32 mm)	Labor- und Medizintechnik Dr. J. Rost, Leipzig, Deutschland
Einmalspritzen Injekt 10 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Immersionsöl™ 518 F	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Kryoröhrchen PP, mit Schraubverschluss, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Microplatte 96 well, PS, F-Boden/Kaminform, schwarz, FLUOTRAC™ 200 medium binding	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Microplatte 96 well, PS, F-Boden/Kaminform, schwarz, FLUOTRAC™ 600 high binding	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mullkompressen steril 5 x 5 cm, 8fach	Maimed GmbH & Co. KG, Neuenkirchen, Deutschland
Pipette 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 1-5 ml Finnpipette®	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold, Deutschland
Pipettenspitzen 1-200 µl, gelb	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen 101-1000 µl, natur	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen 5 ml Plastibrand®	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Reagiergefäß 2,0 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Rundbodenröhrchen PS BD Falcon™ 5 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Spritze Proinjekt 50 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Software AxioVision 4.6	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Software BD CellQuest™ Pro 5.2.1	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Software Imagoquant MultiTrack-AVI-2	Mediquant GmbH, Lützen, Deutschland
Software WinMDI 2.8	The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA
Sterilfilter FP 30/0,2 CA-S	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Sterilfilter Millipore Express™ Plus	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Venenverweilkanüle Vasofix® Braunüle®	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Zählkammer Neubauer improved®

Paul Marienfeld GmbH & Co. KG,
Lauda-Königshofen, Deutschland

3.2 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

ACD-Lösung	0,73 g Citronensäure 2,21 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat 1,98 g D-(+)-Glucose-Monohydrat ad 100,0 ml Aqua dem.
Boratpuffer pH 8,8	618,4 mg Borsäure ad 100,0 ml Aqua dem. pH-Einstellung auf 8,8 mit 1 M NaOH
Calcein-AM-Lösung	50 µg Calcein-AM ad 100 µl DMSO
Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -Lösung 500 mM	7,35 g CaCl ₂ ·2H ₂ O 10,16 g MgCl ₂ ·6H ₂ O ad 100,0 ml Aqua dem.
KCl-Lösung 3 M	22,37 g KCl ad 100,0 ml Aqua dem.
MgCl ₂ -Lösung 1 M	20,33 g MgCl ₂ ·6H ₂ O ad 100,0 ml Aqua dem.
MnCl ₂ -Lösung 100 mM	1,62 g MnCl ₂ ·2H ₂ O ad 100,0 ml Aqua dem.
MnCl ₂ -Lösung 2 mM	1,0 ml MnCl ₂ -Lösung 100 mM ad 50,0 ml Aqua dem.
NaCl-Lösung 1,54 M (10x-Konzentrat)	90,0 g NaCl ad 1000,0 ml Aqua dem.
NaCl-Lösung 154 mM (isotonische Lösung)	100,0 ml NaCl-Lösung (10x-Konzentrat) ad 1000,0 ml Aqua dem.
NaOH 1 M	4,0 g NaOH ad 100,0 ml Aqua dem.
PBS (20x-Konzentrat)	2,0 g KCl 80,0 g NaCl 2,0 g KH ₂ PO ₄ 11,5 g Na ₂ HPO ₄ ad 500,0 ml Aqua dem.

PBS (gebrauchsfertige Lösung)	25,0 ml PBS (20x-Konzentrat) ad 500,0 ml Aqua dem. ggf. pH-Einstellung auf 7,4
PBS+ (gebrauchsfertige Lösung)	1,0 ml $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Lösung 500 mM 25,0 ml PBS (20x-Konzentrat) ad 500,0 ml Aqua dem. ggf. pH-Einstellung auf 7,4
Plättchenpuffer (10x-Konzentrat)	42,4 g NaCl 11,9 g HEPES 0,35 g Na_2HPO_4 8,3 ml 3 M KCl-Lösung 10,0 ml 1 M MgCl_2 -Lösung ad 500,0 ml Aqua dem.
Plättchenpuffer (gebrauchsfertige Lösung)	50,0 ml Plättchenpuffer (10x-Konzentrat) 0,9 g D-(+)-Glucose-Monohydrat 1,5 g BSA ad 500,0 ml Aqua dem.
TRAP-14-Lösung (1,916 mM)	5,0 mg TRAP-14 ad 1500 μl Plättchenpuffer
Waschpuffer 1	0,25 g BSA ad 50 ml PBS
Waschpuffer 1+	0,25 g BSA ad 50 ml PBS+
Waschpuffer 2	0,25 g BSA 0,05 g NaN_3 ad 50 ml PBS
Waschpuffer 2+	0,25 g BSA 0,05 g NaN_3 ad 50 ml PBS+

3.3 Zellkultur

Um Kontaminationen der Zellkulturen mit Pilzen oder Bakterien zu vermeiden, fanden alle Arbeiten mit lebenden Zellen unter aseptischen Bedingungen statt. Alle verwendeten Materialien wurden vor Gebrauch autoklaviert (20 Minuten, 121°C). Die nicht autoklavierbaren Geräte wurden vor der Verwendung mit einem adäquaten Desinfektionsmittel behandelt. Die Arbeiten wurden an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt, die 15 Minuten vor Gebrauch eingeschaltet und mit Bacillo®AF besprüht und ausgewischt wurde. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Inkubator bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5%.

3.4 Inkulturnahme von Zellen (Revitalisierung)

Um Zellen zu kultivieren, wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens schnell per Hand erwärmt und mit 1 ml des entsprechenden Nährmediums versetzt. Diese Zellsuspension wurde zügig mit 8 ml Medium verdünnt, um die Zellen nicht unnötig der schädigenden Wirkung des DMSO, welches im Einfriermedium enthalten ist, auszusetzen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C und 312 g für vier Minuten. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml frischem Medium resuspendiert und anschließend in Kulturflaschen mit vorgelegtem Medium der entsprechenden Menge gegeben.

Ein Mediumwechsel wurde durchgeführt, wenn der Indikator Phenolrot im Nährmedium durch einen Farbumschlag eine Anreicherung des Mediums mit sauren Stoffwechselprodukten der Zellen anzeigt, jedoch die für die entsprechende Zelllinie optimale Zelldichte noch nicht überschritten ist. Dazu werden die Zellen alle ein bis zwei Tage mikroskopisch beurteilt und ggf. gezählt.

3.5 Kryokonservierung von Zellen (Lagerung)

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden die Zellen in Einfriermedium bestehend aus 10% (V/V) DMSO und 90% (V/V) FKS (inaktiviert bei 56°C, 30 Minuten) in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen nach dem Ablösen des Zellrasens von der Kulturflasche (adhärente Zellen) bzw. nach Zentrifugation (Suspensionszellen) in Kryoröhrchen mit 1 ml des Einfriermediums gegeben und anschließend bei -80°C unter Verwendung des Cryo 1°C Freezing Containers für die Dauer von vier Stunden gelagert. Dieses Behältnis erlaubte die kontrollierte Kühlung um -1°C pro Minute. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank überführt.

3.6 Bestimmung der Zellzahl mittels CASY®1 Modell TT

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen nach dem Zentrifugieren in 2 ml des entsprechenden Nährmediums resuspendiert. 20 µl dieser Suspension wurden mit 10 ml sterilfiltrierter CASY®ton Lösung verdünnt.

Bei der Messung wird die Zellsuspension mit konstanter Geschwindigkeit durch eine Kapillare definierter Geometrie gesaugt. An der Kapillare wird über zwei Platinelektroden eine Spannung angelegt. Da es sich bei der mit Elektrolytlösung gefüllten Kapillare um einen elektrischen Leiter mit einem definierten Widerstand handelt, fließt ein Strom von konstanter Stärke. Intakte Zellen können als Isolatoren angesehen werden. Daher verringert sich beim Durchtritt von Zellen durch eine Kapillare der Länge l deren Querschnittsfläche A , wodurch der elektrische Widerstand R der Lösung ansteigt (Gl. 1).

$$R = \rho \frac{l}{A} \quad \rho = \text{spezifischer Widerstand} \quad \text{Gl. 1}$$

Die Höhe der Widerstandsänderung ist ein Maß für das Zellvolumen. CASY®1 TT zeichnet das Integral dieses Messsignals auf (elektronische Pulsflächenanalyse) und berechnet u.a. aus der volumenlinearen Originalverteilung eine durchmesserlineare Größenverteilung. Damit lassen sich Aussagen zu Zellzahl und -größe treffen.

Messeinstellungen: Kapillare \varnothing 150 μm , 2 Messzyklen à 400 μl Einzelhubvolumen, Partikelgröße 8-40 μm , Probenverdünnung 1:500.

3.7 Zelllinien

3.7.1 B16F10

Bei der Zelllinie B16F10 handelt es sich um eine murine Melanomzelllinie. Melanomzellen des Typs B16 werden immundefizienten Mäusen intravenös appliziert und nach Koloniebildung im Lungenparenchym als neue Generation B16F1 entnommen. Durch laufende Wiederholung dieses Vorgangs mit der jeweils neu gewonnenen Zelllinie entstehen weitere B16-Linien wie beispielsweise B16F10, die sich durch ein höheres Lungenmetastasierungspotential als jüngere Zelllinien auszeichnen³¹⁷.

Die Kultivierung erfolgte in D-MEM („high glucose“) unter Zusatz von 10% (V/V) FKS (inaktiviert), 1% (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung und 2 mM L-Glutamin. Alle zwei Tage wurde verbrauchtes Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt. Bei Konfluenz der Zellen wurden diese vom Boden der Kulturflasche gelöst. Dazu wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt und mit 2 ml (Kulturflasche 75 cm^2) bzw. 5 ml (Kulturflasche 175 cm^2) einer 0,02%-igen EDTA-Lösung versetzt. Nach einer Einwirkzeit von einigen Minuten bei 37°C wurden 8 ml bzw. 15 ml Medium hinzugefügt. Die nur noch lose anhaftenden Zellen wurden unter Spülen mit dem Medium von dem Boden der Kulturflasche abgelöst und die erhaltene Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde bei 4°C und 312 g für vier Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Danach wurden die Zellen in 2 ml Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl (s. Kapitel 3.6) wurden die Zellen in Kulturflaschen mit vorgelegten 15 ml bzw. 30 ml Medium zu $5 \cdot 10^5$ bis $1 \cdot 10^6$ bzw. $3 \cdot 10^6$ bis $5 \cdot 10^6$ Zellen pro Kulturflasche pipettiert.

3.7.2 bEnd3

Die murine Zelllinie bEnd3 wurde aus Endothelzellen der Hirnrinde etabliert³¹⁸. BEnd3-Zellen tragen Endothel-spezifische Proteine wie beispielsweise Endoglin. Inflammatorische Zytokine induzieren die Expression von Adhäsionsrezeptoren wie ICAM-1, VCAM-1 und Selektinen.

Zur Kultivierung wurde D-MEM („high glucose“) mit 10% (V/V) FKS (inaktiviert), 1% (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung und 4 mM L-Glutamin verwendet. Die Subkultivierung der bEnd3 erfolgte gemäß 3.7.1.

3.7.3 E-CHO

Hierbei handelt es sich um Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, die nach Transfektion stabil murines E-Selektin auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Die Transfektion erfolgte durch die Arbeitsgruppe um Prof. A. Varki (University of California, La Jolla, CA, USA).

Zur Kultivierung wurde MEM- α + Ribonukleoside + Desoxyribonukleoside mit zusätzlich 10% (V/V) FKS (inaktiviert), 1% (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung und 2 mM L-Glutamin verwendet. Die Durchführung der Subkultivierung erfolgte gemäß 3.7.1. Allerdings wurde zum Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche Trypsin-EDTA-Lösung (0,25%) verwendet.

3.7.4 HepG2

HepG2 ist eine humane Zelllinie, die aus dem Lebergewebe eines 15-jährigen Patienten mit einem gut differenzierten Leberkarzinom stammt³¹⁹.

Die Züchtung der Zellen erfolgte in RPMI-1640-Medium mit 10% (V/V) FKS (inaktiviert) und 1% (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung. Die Subkultivierung erfolgte analog Kapitel 3.7.1.

3.7.5 HT-29

Die humane Zelllinie HT-29 wurde aus dem kolorektalen Adenokarzinom einer 44-jährigen Patientin etabliert³²⁰.

Die Kultivierung fand in D-MEM („high glucose“) unter Zusatz von 10% (V/V) FKS (inaktiviert), 1% (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung, 2 mM L-Glutamin und 1% (V/V) MEM nicht-essentielle Aminosäuren statt. Zur Subkultivierung wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung (1x) vom Kulturflaschenboden abgelöst und anschließend gemäß Kapitel 3.7.1 bearbeitet.

3.7.6 NW1539

Die humane Melanomzelllinie NW1539 wurde im Labor von Prof. Dr. E. Jäger (II. Medizinische Klinik/Onkologie, Nordwestkrankenhaus Frankfurt/Main, Deutschland) von Patienten generiert³²¹. Sie ist kommerziell nicht erhältlich.

Die Kultivierung der NW1539 erfolgte in D-MEM („low glucose“) mit 10% (V/V) FKS (inaktiviert), 1% (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung und 2 mM L-Glutamin. Die Subkultivierung erfolgte analog Kapitel 3.7.1.

3.7.7 U937

Bei U937 handelt es sich im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Zelllinien, die ein adhärentes Wachstum aufweisen, um Suspensionszellen. Sie leiten sich von malignen Zellen aus dem Pleuraerguss eines 37-jährigen Patienten mit einem diffusen histiozytischen Lymphom, einer Untergruppe der Non-Hodgkin-Lymphome, ab³²² und exprimieren konstitutiv PSGL-1³²³.

Für die Kultivierung der U937 wurde RPMI-1640-Medium mit 10% (V/V) FKS (inaktiviert), 1% (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung verwendet. Zweimal pro Woche wurde nach gründlicher Homogenisierung ein Teil der Zellsuspension entfernt und durch frisches Nährmedium ersetzt. Die Zelldichte sollte hierbei zwischen $2 \cdot 10^5$ und $1 \cdot 10^6$ /ml liegen. Einmal pro Woche erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Zellzahl bestimmt (s. Kapitel 3.6) und die Menge an Volumen ermittelt, die

$1 \cdot 10^6$ Zellen enthält. Dieses wurde bei 4°C und 312 g für vier Minuten zentrifugiert. Nach Resuspendieren wurden die Zellen in Kulturflaschen (25 cm^2) mit 20 ml Medium überführt und aufrecht stehend im Inkubator gelagert.

3.8 Thrombozyten

3.8.1 Vorbereitung der Sepharose[®]4B-Säule

Für die Vorbereitung der Säule zur Isolierung von Thrombozyten mittels Größenausschlusschromatographie wurden 80 ml einer Sepharose[®]4B-Suspension auf einen Sterilfilter (Millipore Express[™] Plus) überführt und mittels einer Wasserstrahlpumpe von dem Suspensionsmittel Ethanol 20% (V/V) befreit. Anschließend wurde die Sepharose[®]4B mit 400 ml isotonischer Kochsalzlösung (154 mM NaCl) unter vorsichtigem Rühren gespült und in eine 50 ml-Spritze mit Septum und Auslasshahn gefüllt. Danach ließ man die Kochsalzlösung abtropfen, so dass die Sepharose[®]4B in der Säule komprimiert wurde. Im Anschluss erfolgte das Waschen der Säule mit 50 ml Plättchenpuffer.

3.8.2 Isolierung der Thrombozyten

Thrombozyten wurden aus Vollblut gesunder Probanden isoliert. Zu diesem Zweck wurde die Handvene mittels einer Venenverweilkanüle punktiert und das Blut mit einer Einmalspritze, die zuvor mit ACD-Lösung²²² gespült wurde, aufgezogen. Unmittelbar im Anschluss wurde das Blut in einem Zentrifugenröhrchen mit 1/10 ACD-Lösung durch vorsichtiges Umschwenken gemischt. Die so bereiteten Proben wurden am selben Tag, spätestens jedoch am nächsten Tag nach Lagerung im Kühlschrank, aufgearbeitet. In einigen Fällen konnten die Blutproben freundlicherweise aus den Arztpraxen Dr. med. H. Hünerbein (Niederkassel), Dr. med. P. May (Bonn) sowie Dr. med. E. Schmidt-Recker (Bonn) bezogen werden.

Für die Isolierung der Thrombozyten erfolgte zunächst eine Zentrifugation des Blutes bei 224 g und 37°C für 15 Minuten. Dadurch fand eine Auftrennung der Blutbestandteile

statt, wobei plättchenreiches Plasma erhalten wurde. Dieses wurde vollständig auf die trockene Oberfläche der Sepharose[®]4B-Säule pipettiert und durch Öffnen des Hahnes in die Säule transportiert. Im nächsten Schritt wurden 50 ml Plättchenpuffer auf die trockene Oberfläche der Säule gegeben, was zu einem weiteren Transport der Probe durch die Säule und zur Isolierung der Thrombozyten führte. Eine Trübung des Eluats zeigte hierbei das Vorhandensein von Thrombozyten an.

Die Vitalität der isolierten Thrombozyten wurde mittels Calcein-Markierung überprüft (s. Kapitel 3.9.1). Zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben bei 37°C im Wasserbad aufbewahrt.

3.8.3 Regenerierung der Sepharose[®]4B-Säule

Eine Regenerierung der Sepharose[®]4B war bis zu viermal möglich. Dazu wurde die Säule nach der Thrombozytenisolierung vollständig entleert und die Sepharose[®]4B suspendiert in 400 ml Ethanol 70% (V/V) auf den Sterilfilter (Millipore Express[™] Plus) überführt. Um das Suspensionsmittel zu entfernen und die Sepharose[®]4B für eine weitere Verwendung vorzubereiten, fand eine Behandlung mit isotonischer Kochsalzlösung, wie unter 3.8.1 beschrieben, statt.

3.8.4 Bestimmung der Thrombozytenzahl

Für das Einstellen der benötigten Konzentration wurde die Thrombozytenzahl mit der Neubauer improved[®]-Zählkammer ermittelt. In der Mitte der Kammer befindet sich die Zählfläche, an deren Seiten sich zwei Auflagen anschließen, die um einen genau bekannten Betrag von 0,1 mm gegenüber der Zählfläche erhöht sind. Dadurch wird ein Raum mit definierter Höhe geschaffen. Auf die beiden Auflagen wurde ein plangeschliffenes Deckglas mit etwas Druck geschoben und die Thrombozytensuspension seitlich aufpipettiert. Die Auszählung erfolgte mittels Lichtmikroskopie.

Das Zählgitter der Neubauer improved[®] besteht aus 3 x 3 Großquadraten von je 1 mm Kantenlänge und somit einer Fläche von 1 mm² (Abb. 3-1A). Die vier großen Eckquadrate (grau) werden zur Leukozytenzählung verwendet, wogegen für kleinere Blutbestandteile wie Erythrozyten oder Thrombozyten das zentrale Großquadrat (schwarze Markierung) verwendet wird. Dieses ist wiederum in 5 x 5 kleinere Gruppenquadrate mit je 0,2 mm

Kantenlänge unterteilt (Abb. 3-1B). Eine Besonderheit der Neubauer improved® sind die dreifachen Begrenzungslinien der Gruppenquadrate, bei welchem die mittlere Linie die eigentliche Begrenzung zwischen zwei Feldern darstellt. Weiterhin ist jedes Gruppenquadrat in 4 x 4 Kleinstquadrate mit je 0,05 mm Kantenlänge eingeteilt.

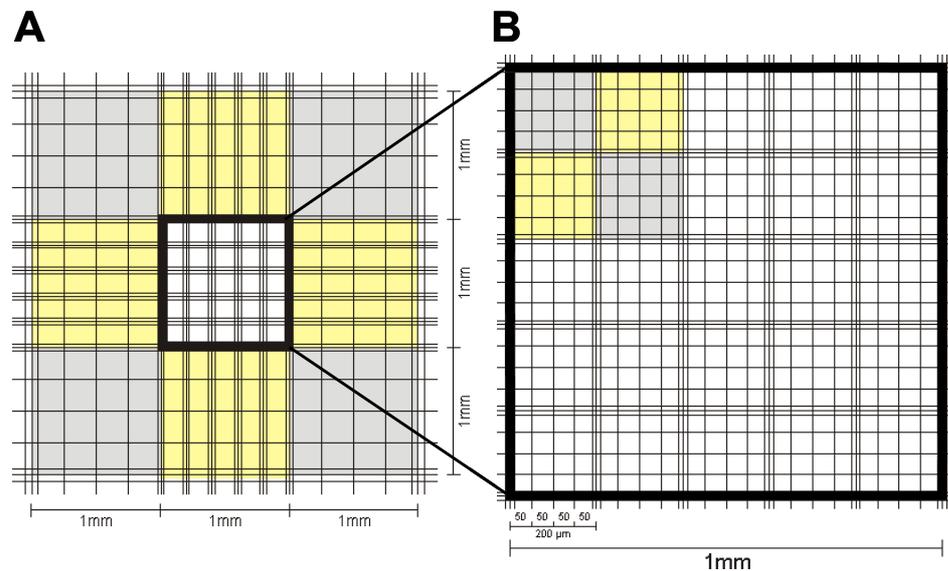


Abb. 3-1: Neubauer improved®-Zählkammer. **A** Das Zählgitter besteht aus 3 x 3 Großquadraten, wobei die vier Eckquadrate (*grau*) zur Leukozytenzählung verwendet werden. **B** Für die Bestimmung der Anzahl von Erythrozyten und Thrombozyten wird das zentrale Großquadrat genutzt.

Zur Ermittlung der Thrombozytenzahl wurden fünf diagonal liegende Gruppenquadrate innerhalb des zentralen Großquadrats ausgezählt und deren Mittelwert bestimmt. Dabei ist es wichtig, dass man auf Grenzlinien liegende Thrombozyten nicht doppelt erfasst. Zu diesem Zweck wurden bei der Auszählung eines Quadrats nur die Thrombozyten auf zwei Begrenzungen (links und unten, jeweils erste und mittlere Linie) mitgezählt. Dieser Zahlenwert wurde mit dem Faktor 250 (25 Gruppenquadrate; Volumen der Kammer $0,1 \text{ mm} \cdot 1 \text{ mm}^2 = 0,1 \text{ mm}^3$) multipliziert, um die Anzahl pro $1 \mu\text{l}$ zu erhalten.

Nach Ermittlung der Gesamthrombozytenzahl im Eluat wurde die Suspension zentrifugiert, das Pellet in dem nötigen Volumen an Plättchenpuffer resuspendiert und bis zum Versuch bei 37°C im Wasserbad aufbewahrt.

Die Zählkammer sowie das Deckglas wurden nach dem Gebrauch mit Ethanol 70% (V/V) gereinigt.

3.8.5 Aktivierung von Thrombozyten

Für die Experimente wurden sowohl ruhende als auch aktivierte Thrombozyten verwendet. Die Aktivierung erfolgte mit TRAP-14 („thrombin receptor agonist peptide-14“), einem synthetischen Peptid bestehend aus den 14 Aminosäuren Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe. Zu 100 µl Thrombozytensuspension wurden 10 µl einer 1,916 mM TRAP-14-Lösung gegeben und für fünf Minuten bei 37°C leicht geschüttelt.

3.9 Fluoreszenzmarkierungen

3.9.1 Markierung von Tumorzellen und Thrombozyten mit Calcein

Für Versuche, die auf Fluoreszenzmessungen beruhen, wurden Tumorzellen sowie Thrombozyten mit Calcein gelabelt. Zunächst erfolgten das Splitten der Zellen gemäß Kapitel 3.7.1 sowie die Isolierung und Aktivierung der Thrombozyten, welche ausführlich im Kapitel 3.8 beschrieben sind.

Für die Markierung wurden zu 5 ml Zell- bzw. Thrombozytensuspension 10 µl (entsprechend 5 µg) Calcein-AM-Lösung gegeben und bei 37°C für 30 Minuten leicht geschüttelt. Während dieser Inkubationszeit wird der nicht-fluoreszierende Calcein-Acetoxy-methylester aufgrund seiner Lipophilie durch die Membran in das Zytoplasma transportiert und dort unspezifisch durch Esterasen gespalten (Abb. 3-2). Das freie Calcein ist in der Lage, Calciumionen zu komplexieren, was nach Anregung bei 485 nm in einer grünen Fluoreszenz mit 520 nm resultiert. Der Komplex verbleibt in der Zelle, da er die Zellmembran aufgrund der ionisierten Form nicht mehr passieren kann.

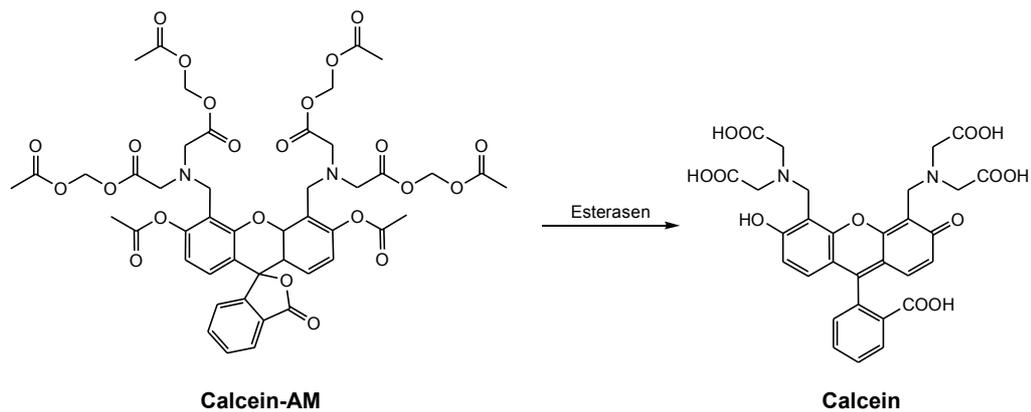


Abb. 3-2: Intrazelluläre Hydrolyse des Calcein-AM. Durch die Spaltung der Esterbindung wird der nicht-fluoreszierende Calcein-Acetoxy-methylester zu grün fluoreszierendem Calcein umgesetzt.

Da nur lebende Zellen ausreichend Enzymaktivität besitzen, um den Ester zu spalten, fluoreszieren nur lebende Zellen nach entsprechender Anregung. Daher kann die Markierung mittels Calcein-AM als Viabilitätstest genutzt werden. Weiterhin ist zu erwähnen, dass viele Zellen über ABC-Transporter Calcein aktiv aus der Zelle ausschleusen können, was sich ebenfalls in einer fehlenden bzw. verminderten Fluoreszenz äußert.

3.9.2 Markierung von Tumorzellen mit Hoechst 33342

Zur Markierung der murinen Melanomzellen B16F10 wurde in einem Teil der Versuche Hoechst 33342 (Abb. 3-3) verwendet. Der Farbstoff wurde in einer Endkonzentration von 3 μM je Vertiefung einer 24-Well-Platte eingesetzt. Die Markierung erfolgte unter Lichtausschluss für 30 Minuten bei 37°C. Innerhalb dieser Zeit passiert der lipophile Fluoreszenzfarbstoff die Zellmembran und interagiert mit der im Zellkern befindlichen DNA. Durch eine Anregung mit ultraviolettem Licht emittiert Hoechst 33342 im sichtbaren Bereich mit blauer Farbe. Das Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 352 nm, das Emissionsmaximum bei 455 nm.

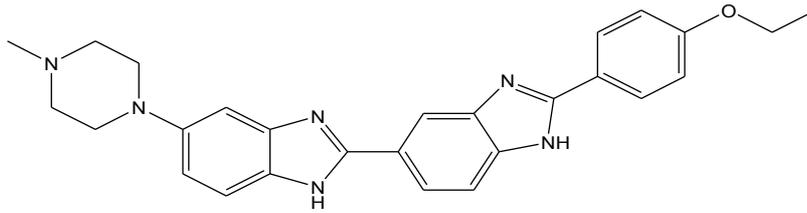


Abb. 3-3: Hoechst 33342. Der lipophile Farbstoff diffundiert in den Zellkern und lagert sich in die DNA ein, was nach Anregung in einer blauen Fluoreszenz der Zellkerne resultiert.

3.10 Statische Zelladhäsionsassays an P-Selektin

3.10.1 Testung der Zugänglichkeit von immobilisiertem P-Selektin

Zur Untersuchung der Zugänglichkeit der immobilisierten P-Selektin-Fc-Chimären wurden 96er Mikrotiterplatten („medium binding“-Platte im Vergleich zu „high binding“-Platte) wie folgt behandelt: 15 μl und 30 μl ($c=0,02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) sowie 5 μl ($c=0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) einer hP-Sel-Lösung wurden entsprechend des Endvolumens von je 50 μl /Well mit der nötigen Menge an PBS+ gemischt. Diese Lösung wurde in die Wells pipettiert und die Mikrotiterplatte über Nacht bei 4°C aufbewahrt.

Um unspezifische Wechselwirkungen zu verhindern, erfolgte am nächsten Tag nach dem Ausschlagen der Platte eine Blockierung mit 1% (m/V) BSA in PBS+ (50 μl /Well) bei RT für eine Stunde. Nach erneutem Ausschlagen wurden je Well 10 μl einer hP-Sel-Antikörper-Lösung (anti-Human-CD62P, FITC-konjugiert) und 40 μl PBS+ eingesetzt und die Platte mit dieser Lösung für 40 Minuten bei 4°C inkubiert. Im Anschluss erfolgten zwei Waschschriffe mit je 50 μl PBS+/Well. Abschließend wurden in jedes Well 50 μl PBS+ pipettiert. Für die Bestimmung des Gains wurden 10 μl hP-Sel-Antikörper-Lösung mit 40 μl PBS+/Well verwendet.

Die Messung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte mithilfe des POLARStar Galaxy (Anregung 485 nm, Emission 520 nm). Die Bindungsfähigkeit des Antikörpers wurde nach Subtraktion des Blindwerts (PBS+) im Vergleich zu 1% (m/V) BSA ermittelt.

3.10.2 Adhäsion von Zellen an P-Selektin

Im nächsten Schritt wurde die Bindungsfähigkeit von Zellen an immobilisierte P-Selektin-Fc-Chimären ermittelt. Zu diesem Zweck wurde eine 96er Mikrotiterplatte („high binding“) wie folgt behandelt: 10 µl mP-Sel-Lösung bzw. 10 µl, 15 µl und 30 µl hP-Sel-Lösung ($c=0,02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurden mit dem entsprechenden Volumen PBS+ bis zu einem Endvolumen von je 50 µl/Well versetzt und die Platte über Nacht bei 4°C gelagert.

Am nächsten Tag erfolgte eine Blockierung mit 1% (m/V) BSA in PBS+ (50 µl/Well) bei RT für eine Stunde. Nach einem Waschschrift mit je 50 µl PBS+ wurden Calcein-markierte Zellen (s. Kapitel 3.9.1) zugesetzt ($1 \cdot 10^4$ Zellen/100 µl/Well). Daran schloss sich eine Inkubation bei 4°C für zwei Stunden an, gefolgt von zwei Waschschriften mit je 50 µl PBS/Well. Abschließend wurden in jedes Well 100 µl PBS+ pipettiert. Für die Bestimmung des Gains wurden 100 µl Zellsuspension/Well verwendet.

Die Messung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte mithilfe des POLARStar Galaxy (Anregung 485 nm, Emission 520 nm). Die Bindungsfähigkeit der Zellen wurde nach Subtraktion des Blindwerts (PBS+) im Vergleich zu 1% (m/V) BSA ermittelt.

3.11 Mikroskopische Untersuchungen zur Zelladhäsion unter physiologischen Flussbedingungen

3.11.1 Präparation der Modellmembranen

3.11.1.1 Reinigung der Glasträger

Als Träger für die mikroskopischen Untersuchungen wurden runde Deckgläschen aus Glas der Stärke 3 (0,28-0,32 mm) und mit einem Durchmesser von 18 mm verwendet. Zum Zweck der Reinigung wurden die Deckgläschen in einem Gemisch aus sieben Teilen Schwefelsäure 95-97% und drei Teilen Wasserstoffperoxid 30% für 20 Minuten bei einer Temperatur von 80°C behandelt. Anschließend wurde zehnmal mit demineralisiertem Wasser gespült. Eine weitere 20-minütige Behandlung im Ultraschallbad bei 80°C mit ei-

nem Gemisch aus einem Teil Ammoniaklösung 26%, einem Teil Wasserstoffperoxid 30% und fünf Teilen demineralisiertem Wasser diente der Reduktion aller Oberflächenmoleküle zum Silanol. Abschließend wurden die Deckgläschen erneut zehnmal mit demineralisiertem Wasser gespült und im Trockenschrank bei 60°C getrocknet.

3.11.1.2 Immobilisierung der Rezeptorproteine (Selektine, VCAM-1)

Für die kovalente Immobilisierung der Rezeptorproteine wurde Cyanurchlorid als Koppelpartner zwischen Glas und Protein verwendet. Im ersten Schritt wurden die gereinigten Deckgläschen für 20 Minuten im Ultraschallbad mit einer Lösung von 1 mg/ml Cyanurchlorid in trockenem Chloroform behandelt. Unter Abspaltung von Chlorwasserstoff reagieren die Hydroxylgruppen der Silanole mit Cyanurchlorid, wie in Abb. 3-4 dargestellt. Danach wurden die Deckgläschen erneut unter Ultraschalleinfluss 20 Minuten mit trockenem Chloroform gespült. Anschließend erfolgte eine Trocknung bei 60°C. Die so behandelten Glaträger waren mehrere Wochen verwendbar.

Im nächsten Schritt wurde das Rezeptorprotein an die Cyanurchlorid-haltige Glasoberfläche gebunden. Dazu wurde das Glasplättchen mit einer Reaktionslösung bestehend aus 10 µl, 15 µl bzw. 20 µl Rezeptorproteinlösung ($c=0,02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), 10 µl BSA-Lösung 4% (m/V) und 60 µl Boratpuffer pH 8,8 beschichtet und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Bei diesem pH-Wert reagiert die zweite reaktive Gruppe des Cyanurchlorids mit freien Aminogruppen des jeweiligen Rezeptorproteins unter erneuter Abspaltung von Chlorwasserstoff. Abschließend wurde mit demineralisiertem Wasser gespült und sofort der Zellversuch durchgeführt (s. Kapitel 3.11.4).

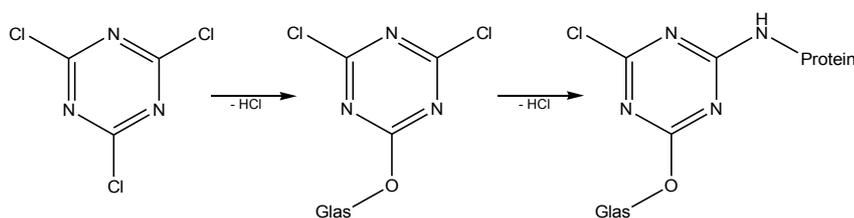


Abb. 3-4: Kopplungsreaktionen von Cyanurchlorid. Cyanurchlorid wird unter HCl-Abspaltung zunächst an die Silanolgruppen des Glaträgers gebunden. In einem zweiten Schritt reagiert Cyanurchlorid unter erneuter HCl-Abspaltung mit der Aminogruppe des Rezeptorproteins. Mit dieser Methode ist eine kovalente Immobilisierung des gewünschten Proteins auf der Oberfläche des Glaträgers möglich.

3.11.1.3 Präparation von planaren sLe^x-haltigen Bilayern

Für die Herstellung einer sLe^x-haltigen Modellmembran kam die Langmuir-Blodgett-Technik zum Einsatz, deren Funktionsweise detailliert beschrieben ist³²⁴.

Die gereinigten Glasträger (s. Kapitel 3.11.1.1) wurden in Monochlorodimethyloctadecylsilan bei 70°C für zehn Minuten inkubiert. Dabei wird das Silan kovalent an die Glasoberfläche gebunden und bewirkt eine Hydrophobisierung (Abb. 3-5A). Die Bindungsreaktion wurde durch Spülen mit Chloroform, Waschen mit demineralisiertem Wasser und Trocknen mittels Luftstrom abgeschlossen. Im nächsten Schritt wurden Monolayer aus DSPC als Matrixlipid mit 0,01 mol% des Liganden sLe^xLac1 an der Luft-Wasser-Grenzphase des Langmuir-Trogs erzeugt (Abb. 3-5B). Nach dem Verdichten der Lipidschicht bei einem lateralen Druck von 38 mN/m wurden die silanisierten Glasträger vertikal durch die Schicht gefahren, was in einer Komplettierung der Bilayer resultierte (Abb. 3-5C).

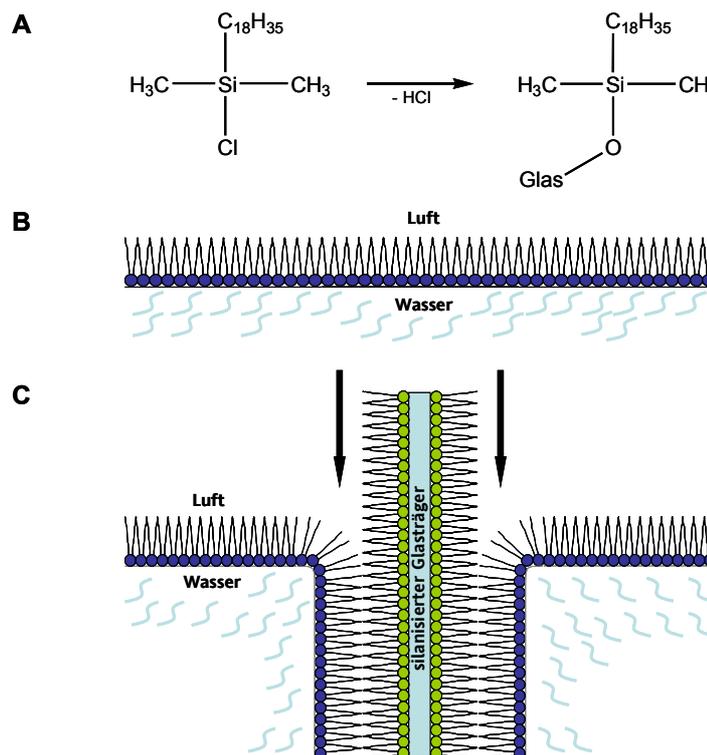


Abb. 3-5: Präparation von sLe^x-haltigen Bilayern. **A** Der Glasträger wird zunächst mittels Monochlorodimethyloctadecylsilan hydrophobisiert. **B** An der Luft-Wasser-Grenzfläche des Langmuir-Trogs erfolgt im nächsten Schritt die Bildung einer Monolayer aus DSPC mit 0,01 mol% sLe^xLac1. **C** Durch die vertikale Bewegung des silanisierten Glasträgers durch die DSPC-Schicht wird die sLe^x-haltige Bilayer erzeugt. (modifiziert nach Christ³²⁴)

Die frisch präparierten Modellmembranen wurden sofort für die Zellrollversuche mit E-CHO verwendet. Dazu wurden die Glasträger unter Ausschluss von Luftkontakt, um die Integrität der Bilayer zu garantieren, in die Flusskammer eingebaut (s. Kapitel 3.11.3).

3.11.2 Präparation von Endothelzellschichten

Für die Untersuchung von Tumorzell-Endothelzell-Interaktionen wurden Glasträger mit konfluent bewachsenen bEnd3 verwendet. Zu diesem Zweck wurde je ein autoklaviertes, rundes Deckgläschen (Dicke 0,28-0,32 mm; Durchmesser 18 mm) in ein Well einer 6-Well-Platte gelegt und mit jeweils $5 \cdot 10^4$ bEnd3 in einem möglichst kleinen Volumen Nährmedium (ca. 10 μ l) versehen. Anschließend wurden jeweils 150 μ l Medium auf jedes Glasplättchen getropft und vorsichtig mit den Zellen gemischt. Daran schloss sich eine sechsstündige Inkubationszeit im Brutschrank an, in welcher die Zellen die Möglichkeit zur Sedimentation und Adhäsion hatten. Nach dieser Phase wurde das Medium behutsam am Rand des Glasträgers mittels einer Pipette abgezogen und je Well 3 ml frisches Nährmedium dazu gegeben. Danach wurde die 6-Well-Platte in den Inkubator überführt. Nach etwa 36 Stunden erreichten die bEnd3 Konfluenz und konnten für den Versuch in der Flusskammer verwendet werden. Vor dem Einbau der Glasträger in die Durchflusskammer erfolgte eine Stimulation der bEnd3 mit TNF- α (50 ng/ml) für einen Zeitraum von vier Stunden.

3.11.3 Aufbau der Durchflussapparatur

Zur Untersuchung des Tumorzellverhaltens unter Fließbedingungen wurde die von Jan Vogel entwickelte Durchflusskammer verwendet³⁴. Sie wurde aus einem transparenten Polyacrylblock gefräst. Die eigentliche Durchflusskammer mit den Maßen 11 mm x 6 mm x 0,45 mm wurde am Boden des Blocks herausgearbeitet (Abb. 3-6A). Durch abgerundete Ecken wird einer Verwirbelung der durch Schlauchanschlüsse eingespülten Flüssigkeit vorgebeugt. Das beschichtete Deckgläschen (s. Kapitel 3.11.1.2, 3.11.1.3 und 3.11.2) wurde auf der Unterseite der Kammer mittels eines schraubbaren Metallrings und Gummidichtung eingebaut (Abb. 3-6B).

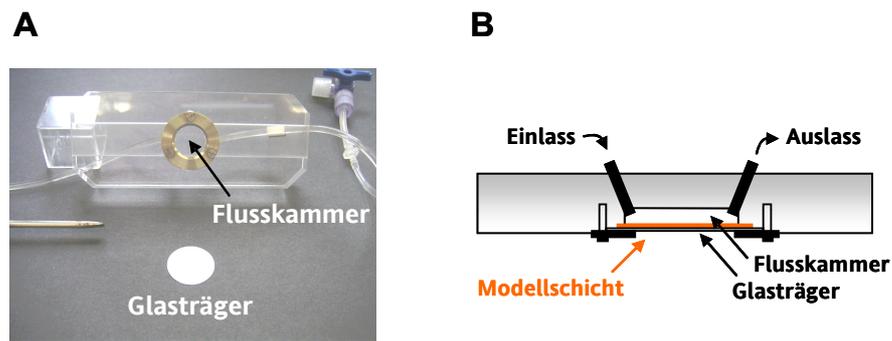


Abb. 3-6: Durchflussapparat für die Untersuchung der Zelladhäsion unter Strömungsbedingungen. **A** Der Glasträger wird nach Beschichtung mit Rezeptorprotein, Bilayer oder Endothelzellen in die Flusskammer eingebaut. **B** Die schematische Darstellung zeigt die Durchflussapparatur im Querschnitt nach dem Einbau des Glasträgers. Einlass und Auslass gewähren das Durchströmen der Kammer mit Fließmedium.

Vor die Flusskammer wurde eine Blasenfalle geschaltet, so dass ein Eindringen von Luft in das System vermieden werden konnte. Andererseits erlaubte die Blasenfalle die Zugabe von Zellsuspensionen und Testsubstanzen.

3.11.4 Durchführung des Zelladhäsionsassays und Testung potentieller Inhibitoren

Die Flusskammer wurde nach dem Einbau des mit Rezeptorproteinen, Bilayer oder Endothelzellen beschichteten Glasträgers auf dem Objektisch des Axiovert 200 installiert. Als Fließmedium diente PBS (im Fall der Untersuchungen an E-, L- und P-Selektin PBS+), der zu Beginn des Versuches auf 20°C temperiert sowie luftblasenfrei in das gesamte System überführt wurde. Die Durchflussrate Q wurde entweder per hydrostatischem Druck oder durch Verwendung eines Pumpsystems auf 2 ml/min eingestellt, was gemäß Gl. 2 einer in postkapillaren Venolen herrschenden Scherrate G von ca. 200/s entspricht.

$$G = \frac{6Q}{bh^2}$$

b = Breite der Flusskammer (6,00 mm)

h = Höhe der Flusskammer (0,45 mm)

Gl. 2

Für die Durchflussuntersuchungen mittels Pumpsystem wurden $2 \cdot 10^6$ suspendierte U937 bzw. E-CHO in einem Volumen von 200 μ l FKS-freiem Nährmedium in ein Reagier-

gefäß gefüllt und an den Rundlauf angeschlossen. Durch Betätigen der Pumpe wurde der Kreislauf in der erforderlichen Geschwindigkeit gestartet, wobei die Zellen aus dem Reservoir in die Flusskammer gelangten. Nach fünf Minuten wurde eine Videosequenz aufgenommen (Kontrollexperiment). Direkt im Anschluss wurde die Testsubstanz über das Reservoir in den fließenden Puffer gegeben und nach weiteren fünf Minuten ein zweites Video aufgezeichnet. Um die Beeinflussung der Zelladhäsion durch die eingesetzte Substanz zu quantifizieren, wurde die Zellanzahl nach Testsubstanz-Zugabe in Relation zum Kontrollexperiment gesetzt.

Alternativ wurde die hydrostatische Methode eingesetzt. Hierbei wurde das Fließmedium in einen 250 ml-Scheidetrichter mit Schlauchansatz überführt. Durch Regulierung der Höhendifferenz zwischen Scheidetrichter und Schlauchende im Auffanggefäß konnte die Durchflussrate eingestellt werden. Bei dieser Methode wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen in 100 μ l FKS-freiem Nährmedium (Kontrollexperiment) oder mit der angegebenen Menge an Testsubstanz bzw. P-Selektin- oder VCAM-1-Antikörper (anti-Maus-CD62P, anti-Maus-CD106, jeweils 20 μ l, $c=0,5$ mg/ml) gemischt und sofort in die Blasenfalle gegeben.

Bei der Untersuchung des Einflusses von Thrombozyten auf das Verhalten der Tumorzellen wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen in 100 μ l Nährmedium mit $1 \cdot 10^8$ ruhenden bzw. aktivierten Thrombozyten (s. Kapitel 3.8) in 100 μ l Plättchenpuffer gemischt und für zehn Minuten unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden Zellen und Thrombozyten in die Blasenfalle gegeben.

Eine Besonderheit stellten die Experimente zur Untersuchung der Wechselwirkung von Zellen mit VCAM-1 dar. Hierbei wurden vor dem Pipettieren der Zellen in die Blasenfalle $1 \cdot 10^6$ suspendierte B16F10 in 50 μ l Medium mit 50 μ l einer 2 mM $MnCl_2$ -Lösung bei 37°C für fünf Minuten unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Testsubstanzen wurden zum Teil vor der Zugabe der Zellen in die Blasenfalle ebenfalls für fünf Minuten bei 37°C mit den Zellen inkubiert.

Durch das Öffnen der an den Schläuchen befindlichen Hähne wurde der Durchfluss gestartet und die Zellen in das Sichtfeld des Objektivs gespült. Der Fluss wurde daraufhin für fünf Minuten (in Gegenwart von Thrombozyten für zehn Minuten) unterbrochen, damit eine Sedimentation der Zellen auf die Schicht erfolgen konnte. Nach diesem Zeitraum wurde der Fluss wieder angestellt und das Verhalten der Zellen aufgezeichnet.

3.11.5 Auswertung mittels Imagoquant MultiTrack-AVI-2

Die Videosequenzen wurden mit 25 Bildern pro Sekunde mittels einer CSC-795-Kamera unter Verwendung eines „long distance“ (LD)-Objektives mit 10facher bzw. 20facher Vergrößerung aufgenommen und mit der Software Imagoquant MultiTrack-AVI-2 ausgewertet (Abb. 3-7). Der Einsatz dieser Software erlaubte sowohl die Bestimmung der Zellanzahl als auch die Angabe der Geschwindigkeit, mit der sich die Zellen über die Schicht fortbewegen.

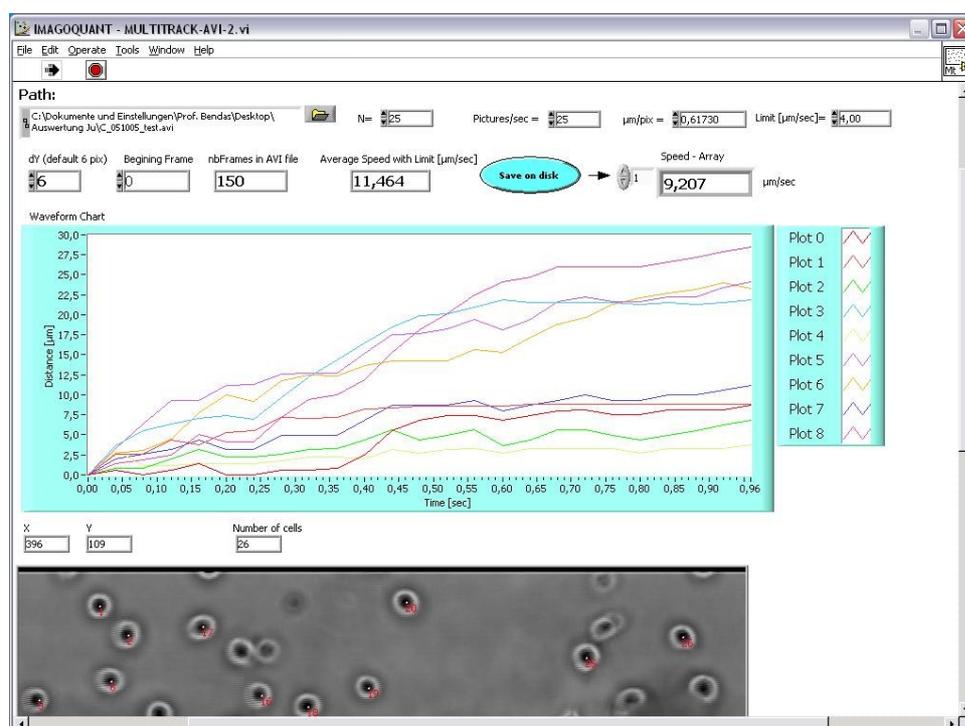


Abb. 3-7: Auswertung mittels Imagoquant MultiTrack-AVI-2.

N	Anzahl der Bilder, die in die Auswertung eingehen
Pictures/sec	Aufnahmegeschwindigkeit der Videokamera
µm/pix	Verhältnis zwischen Pixeln und Distanz unter Verwendung des LD-Objektives mit 20facher Vergrößerung
Limit [µm/sec]	Geschwindigkeitslimit
Average Speed [µm/sec]	Durchschnittsgeschwindigkeit der Zellen pro N Bilder
Number of cells	Zellanzahl pro Bild

Um die Zelladhäsion zu bestimmen, wurde die Anzahl durch manuelles Markieren jeder Zelle zu jeder Sekunde bzw. alle zwei Sekunden ermittelt (von $t=0$ s bis $t=4$ s bzw. $t=8$ s) und durch die Anzahl bei $t=0$ s dividiert. Die Ergebnisse wurden als prozentuale Adhäsion ausgedrückt und zum Teil in Relation zum Kontrollexperiment gesetzt. Parallel wurde die Geschwindigkeit der Zellen innerhalb einer Zeitspanne von einer Sekunde über

die gesamte Videosequenz bestimmt. Das Programm verfolgt jede einzelne Zelle über den angegebenen Zeitraum und gibt die Einzel- sowie Durchschnittsgeschwindigkeit an. Diese Art der Auswertung, d.h. das Teilen der Gesamtsequenz, erlaubt die Minimierung von Fehlern, die durch das Verlieren von Zellen durch das Programm auftreten könnten. Außerdem ermöglicht die Angabe eines Geschwindigkeitslimits (4 $\mu\text{m/s}$) die Unterscheidung zwischen adhärennten und sich fortbewegenden Zellen. Diejenigen Zellen, deren Werte unterhalb des Limits liegen, gehen nicht in die Berechnung der Durchschnittsgeschwindigkeit ein. Zur Auswertung wurden jeweils alle Zellen pro Bild (ca. 100) herangezogen.

3.12 Fluoreszenzmikroskopie

3.12.1 Untersuchung der Interaktion von murinen Melanomzellen mit Thrombozyten in Gegenwart von P-Selektin-Inhibitoren

Zur Ermittlung der Wechselwirkungen von B16F10-Melanomzellen mit Thrombozyten wurden die Tumorzellen gemäß Kapitel 3.7.1 gesplittet, nach Zellzahlbestimmung (s. Kapitel 3.6) zu $2,5 \cdot 10^4/500 \mu\text{l/Well}$ in eine 24-Well-Platte pipettiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurden humane Thrombozyten aus Vollblut, wie in den Kapiteln 3.8 und 3.9.1 beschrieben, isoliert, zum Teil mit TRAP-14 aktiviert und mit Calcein-AM gelabelt. Desweiteren erfolgte eine Markierung der Melanomzellen mit Hoechst 33342 (s. Kapitel 3.9.2). Nach der Inkubationszeit wurde das Farbstoff-haltige Nährmedium mit einer Pipette abgesaugt und jedes Well mit 1 ml PBS+ versetzt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von je $2 \cdot 10^5$ ruhenden bzw. aktivierten, gelabelten Thrombozyten mit oder ohne Inhibitor (Kontrollexperiment). Tab. 3-1 gibt die eingesetzten Substanzen wieder.

Tab. 3-1: Testsubstanzen

Substanz	eingesetzte Mengen		
Heparin-Natrium 5000 ratiopharm®	50 µg	250 µg	500 µg
Enoxaparin-Natrium (Clexane®)	50 µg	250 µg	500 µg
PhyS-4	50 µg	250 µg	500 µg

PhyS-4, Phycarinsulfat-4.

Die 24-Well-Platte wurde daraufhin für 15 Minuten bei RT auf einen Schüttler gestellt. In dieser Zeit fand eine Wechselwirkung der Thrombozyten mit den adhärennten Melanomzellen statt. Abschließend erfolgte zweimaliges Waschen mit je 500 µl PBS+.

Die Analyse erfolgte mithilfe des Mikroskops Axiovert 200 (LD-Objektiv, 10fache Vergrößerung). Dabei kamen neben der Betrachtung im Phasenkontrast die Fluoreszenzfilter FITC (für Calcein-markierte Thrombozyten) und DAPI (für Hoechst 33342-markierte B16F10) zum Einsatz. Mittels AxioCam MRc erfolgte das Aufnehmen der Bilder, die mit der Software AxioVision 4.6 gespeichert und bearbeitet wurden.

3.12.2 Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Heparin an Tumorzellen

Die Melanomzellen B16F10 wurden hinsichtlich der Wechselwirkung mit Heparin untersucht. Zu diesem Zweck wurde FITC-gelabeltes Heparin eingesetzt, welches die Betrachtung der Fluoreszenz ermöglichte.

100 µl Zellsuspension mit ca. $4 \cdot 10^5$ Zellen wurden in der Zentrifuge mini Spin für 20 Sekunden pelletiert und vom Nährmedium befreit. Es erfolgten im Anschluss dreimaliges Waschen mit je 100 µl HBSS und Resuspendieren in 50 µl HBSS. Zu dieser Suspension wurden 5 µl einer Lösung von FITC-gelabeltem Heparin (entsprechend 50 µg) pipettiert und für fünf Minuten bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 50 µl HBSS resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde ein Tropfen mittig auf einen Objektträger pipettiert, mit einem Deckgläschen bedeckt und mit dem Axiovert 200 (Ölimmersionsobjektiv, 63fache Vergrößerung) im FITC-Kanal betrachtet. Die Bilder wurden mit der AxioCam MRc aufgenommen und mittels AxioVision 4.6 gespeichert und bearbeitet.

3.13 Durchflusszytometrie

3.13.1 Prinzip der Methode

Die Durchflusszytometrie, auch als „fluorescence activated cell sorting“ (FACS) bezeichnet, ermöglicht es, unterschiedliche Eigenschaften von Einzelzellen oder Teilchensuspensionen zu untersuchen. Dabei wird jede Zelle einzeln von einem Laserstrahl erfasst und kann anhand von Streuung, Brechung und emittierter Fluoreszenz charakterisiert werden. Für die Messung wird die Zellsuspension mithilfe von Druckluft durch eine Kapillare in die Messküvette transportiert. Die Zellen werden anschließend beschleunigt, vereinzelt und passieren einen Argonlaser, der bei einer Wellenlänge von 488 nm anregt. Die durch die Zellen verursachten Effekte werden durch ein optisches System analysiert. In Abhängigkeit vom Detektionswinkel erhält man verschiedene Informationen über die Zelle. Das parallel zur Einstrahlungsrichtung gestreute Licht („forward scatter“, FSC) erlaubt Aussagen zu Oberfläche und Größe der Zellen, während das im 90°-Winkel zum Laserstrahl gemessene Seitwärtsstreulicht („side scatter“, SSC) aus intrazellulären Strukturen resultiert und somit Rückschlüsse auf die Granularität der Zelle zulässt. Weitere Informationen werden aus den gleichzeitig durchgeführten Fluoreszenzmessungen erhalten. Bei Markierung bestimmter zellulärer Strukturen mit Fluoreszenzfarbstoffen oder gelabelten Antikörpern können diese durch das eingestrahlte Laserlicht zur Fluoreszenz angeregt werden.

Zur Detektion des Fluoreszenzlichts wurde in den unten aufgeführten Experimenten der Filter FL1 verwendet. Dabei handelt es sich um einen Bandpass-Filter, der für Licht der Wellenlängen 515 nm bis 545 nm durchlässig ist.

Zur Auswertung der Daten wurden die Softwares BD CellQuest™ Pro 5.2.1 und WinMDI 2.8 verwendet. Je nach Zelltyp wurden die Analysefenster entsprechend der Zellgröße (FSC) und der Zellgranularität (SSC) gesetzt.

3.13.2 Bindungsfähigkeit von Tumorzellen an P-Selektin

Die Zelllinien B16F10, HepG2, HT-29, NW1539 und U937 wurden hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit an humane bzw. murine P-Selektin-Fc-Chimären untersucht.

Die adhärennten Zellen wurden zunächst vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Von den Suspensionszellen U937 wurde ein ausreichendes Volumen verwendet. Die Zellsuspensionen wurden zunächst bei 4°C und 312 g für vier Minuten zentrifugiert und das Pellet mit je 2 ml kaltem Waschpuffer 1+ gewaschen. Es folgten eine weitere Zentrifugation und ein Waschschriff mit je 5 ml Waschpuffer 2+. Von dieser Suspension wurden 20 µl zur Zellzahlbestimmung (s. Kapitel 3.6) genutzt, bevor eine erneute Zentrifugation stattfand. Das Pellet wurde in dem nötigen Volumen an Waschpuffer 2+ aufgenommen, so dass die Zellkonzentration $1 \cdot 10^6/100 \mu\text{l}$ betrug.

Von dieser Suspension wurden jeweils 100 µl in Rundbodenröhrchen überführt und mit 7,5 µl, 15 µl bzw. 30 µl einer hP-Sel- bzw. mP-Sel-Lösung ($c=0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) versetzt. Diese Ansätze wurden für 30 Minuten bei RT inkubiert und im Anschluss zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde entfernt und die Pellets in je 100 µl Waschpuffer 2+ resuspendiert. Daraufhin erfolgten die Zugabe von je 10 µl anti-Human-IgG (Fc-spezifisch, FITC-konjugiert) und eine 30-minütige Inkubation auf Eis unter Lichtausschluss.

Eine Zentrifugation, anschließende Zugabe von je 2 ml Waschpuffer 2+ und erneute Zentrifugation schlossen sich an. Abschließend wurden die Pellets in je 1 ml kaltem Waschpuffer 1+ resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert.

3.13.3 Bindungsfähigkeit von B16F10 an E-, L- und P-Selektin sowie Untersuchung der Inhibition durch PhyS-4

Für die Ermittlung der Wechselwirkung von B16F10 mit allen drei Selektinen wurden die Zellen zunächst gemäß Kapitel 3.13.2 vorbereitet. Von der Zellsuspension wurden jeweils 100 µl in Rundbodenröhrchen überführt und mit 10 µl einer mE-Sel-, mL-Sel- bzw. mP-Sel-Lösung ($c=0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) versetzt. Bei einigen Ansätzen erfolgte die Untersuchung des Einflusses von PhyS-4. Zu diesem Zweck wurden je 10 µl des Selektins mit jeweils 10 µl PhyS-4 ($c=1 \text{ mg/ml}$) vor der Zugabe zur Zellsuspension gemischt. Alle Proben wurden im Anschluss für 30 Minuten bei RT inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach der unter 3.13.2 beschriebenen Methode.

3.13.4 PSGL-1 Expression auf Tumorzellen

Die Expression von PSGL-1 wurde auf den Zelllinien B16F10, HepG2, HT-29, NW1539 und U937 untersucht. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.13.2 beschrieben, vorbereitet und auf die Konzentration von $1 \cdot 10^6/100 \mu\text{l}$ mit Waschpuffer 2 eingestellt.

Zu jeweils $100 \mu\text{l}$ Zellsuspension wurden $10 \mu\text{l}$ anti-Human-CD162 bzw. anti-Maus-CD162 ($c=0,5 \text{ mg/ml}$) pipettiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgten ein Zentrifugationschritt, das Resuspendieren in je $100 \mu\text{l}$ Waschpuffer 2 und die Zugabe von je $10 \mu\text{l}$ anti-Maus IgG₁ (FITC-konjugiert, $c=0,5 \text{ mg/ml}$) bzw. anti-Ratte-IgG₁ (FITC-konjugiert, $c=0,5 \text{ mg/ml}$). Die sekundären Antikörper wurden 30 Minuten auf Eis mit den Zellen inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach der unter Kapitel 3.13.2 geschilderten Methode.

3.13.5 P-Selektin-Expression auf Thrombozyten

Um die Expression von P-Selektin auf der Oberfläche ruhender und aktivierter Thrombozyten nachzuweisen, wurden diese zunächst gemäß Kapitel 3.8 isoliert, auf die Konzentration $1 \cdot 10^8/100 \mu\text{l}$ mit Plättchenpuffer eingestellt und zum Teil mit TRAP-14 aktiviert (s. Kapitel 3.8.5). Auf je $100 \mu\text{l}$ Thrombozytensuspension in Rundbodenröhrchen wurden 5 ml PBS+ gegeben und bei RT und 224 g für sieben Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde daraufhin in $60 \mu\text{l}$ PBS+ resuspendiert und mit $10 \mu\text{l}$ anti-Human-CD62P (FITC-konjugiert) für 15 Minuten bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Danach wurden $500 \mu\text{l}$ Waschpuffer 1+ zugefügt und die Proben vermessen.

3.13.6 Interaktion von Thrombozyten mit Tumorzellen

Um die Wechselwirkungen von Thrombozyten mit den Zelllinien B16F10, HepG2, HT-29, NW1539 und U937 zu ermitteln, wurden die Thrombozyten entsprechend Kapitel 3.8 isoliert. Nach der Bestimmung der Anzahl wurde die erforderliche Konzentration von $1 \cdot 10^8/100 \mu\text{l}$ mittels Plättchenpuffer eingestellt und anschließend ein Teil der Thrombozyten mit TRAP-14 aktiviert (s. Kapitel 3.8.5). Im Anschluss daran erfolgte eine Calcein-

Markierung der Thrombozyten gemäß Kapitel 3.9.1. Die Zellen wurden analog Kapitel 3.13.2 vorbereitet und auf $1 \cdot 10^6/100 \mu\text{l}$ mit Waschpuffer 2+ eingestellt.

100 μl Thrombozytensuspension (ruhend bzw. aktiviert) wurden mit 100 μl Zellsuspension gemischt und unter leichtem Schütteln für fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Sollte der Einfluss eines P-Selektin-Antikörpers untersucht werden, wurden vor der gemeinsamen Inkubation je 5 μl anti-Human-CD62P ($c=0,5 \text{ mg/ml}$) zugefügt.

Abschließend wurde mit je 800 μl Waschpuffer 1+ auf 1 ml aufgefüllt und analysiert, wobei die Erhöhung der Fluoreszenz in dem Bereich der Tumorzellpopulation die Adhäsion der Thrombozyten an die Tumorzellen charakterisiert³²⁵.

3.13.7 VLA-4-Expression auf B16F10

Die Zellen wurden, wie unter 3.13.2 beschrieben, vorbereitet und mit Waschpuffer 2 auf die Konzentration von $1 \cdot 10^6/100 \mu\text{l}$ eingestellt.

Zu jedem Ansatz erfolgte die Zugabe von 10 μl einer anti-Maus-CD49d-Lösung ($c=0,5 \text{ mg/ml}$), die mit den Tumorzellen 30 Minuten auf Eis inkubiert wurde. Daran schloss sich eine Zentrifugation bei 4°C und 312 g für vier Minuten an. Die überstehende Flüssigkeit wurde abgesaugt und das Pellet in je 100 μl Waschpuffer 2 resuspendiert. Danach wurden jeweils 10 μl anti-Ratte-IgG_{2a} (FITC-konjugiert, $c=0,5 \text{ mg/ml}$) zugesetzt und für 30 Minuten auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert.

Das weitere Vorgehen entsprach der unter Kapitel 3.13.2 erläuterten Durchführung.

3.13.8 Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Heparin an Tumorzellen

Die Wechselwirkung von FITC-gelabeltes Heparin wurde bereits mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (s. Kapitel 3.12.2) und sollte mithilfe der Durchflusszytometrie bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurden B16F10 gemäß Kapitel 3.13.2 präpariert und mit Waschpuffer 2 auf $1 \cdot 10^6/100 \mu\text{l}$ eingestellt. Danach wurden jeweils 5 μl FITC-gelabeltes Heparin (entsprechend 50 μg) zugesetzt und für fünf Minuten bei 37°C unter Lichtausschluss inkubiert. Vor der Vermessung der Proben erfolgten eine Zentrifugation bei 4°C und 312 g für vier Minuten sowie Resuspendieren in je 1 ml kaltem Waschpuffer 1.

3.14 Testsubstanzen

3.14.1 Fucoïdan

Bei Fucoïdanen handelt es sich um natürliche Polysaccharide, die aus dem braunen Seetang isoliert werden und in zwei unterschiedlichen Homofucosegrundgerüsten vorkommen. Der erste Typ besteht aus sich wiederholenden α -1,3-glykosidisch verknüpften Fucoseeinheiten (Abb. 8A), während Typ 2 abwechselnd α -1,3- und α -1,4-Bindungen aufweist (Abb. 8B).

Fucoïdane des ersten Typs sind in Seetang der Arten *Laminaria saccharina*, *Fucus vesiculosus* und *Cladophoron okamurans* zu finden. Die zweite Verknüpfungsform ist in *Fucus evanescense*, *Fucus distihus* und *Ascophyllum nodosum* anzutreffen.

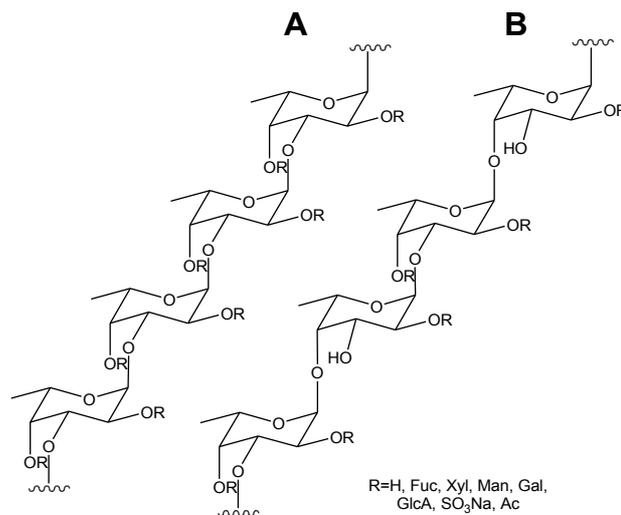


Abb. 3-8: Fucoïdan. **A** Fucoïdan des Typs 1 besteht ausschließlich aus α -1,3-glykosidisch verknüpften Fucoseeinheiten. **B** Fucoïdan des Typs 2 ist durch abwechselnde Bindungen der Form α -1,3 und α -1,4 gekennzeichnet.

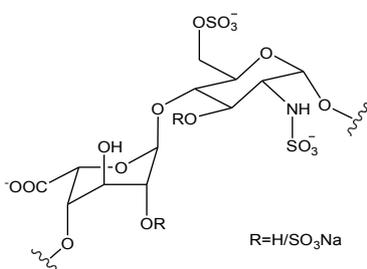
In dieser Arbeit wurde niedermolekulares Fucoïdan mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 8,2 kD eingesetzt, welches hauptsächlich aus *Ascophyllum nodosum* extrahiert wurde.

3.14.2 Heparine

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausgehend von unfraktioniertem Heparin UFH 1 die niedermolekularen Heparine MMWH, LMWH und VLMWH in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. S. Alban (Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Deutschland) produziert³²⁶ und freundlicherweise für die Testung zur Verfügung gestellt.

Die entsprechenden Sulfatierungsgrade und durchschnittlichen Molekulargewichte der verwendeten Heparine sind in Tab. 3-2 zusammengefasst.

Tab. 3-2: Heparine

Formel	Substanz	DS	MW [kD]
	UFH 1		15,0
	MMWH	DS=1,2 für alle Verbindungen	10,5
	LMWH		6,0
	VLMWH		3,4

DS, „degree of sulfation“; LMWH, „low molecular weight heparin“; MMWH, „medium molecular weight heparin“; MW, „molecular weight“; UFH, unfraktioniertes Heparin; VLMWH, „very low molecular weight heparin“.

Neben den aufgeführten Heparinen kamen zwei kommerziell erhältliche UFHs zum Einsatz: Liquemin[®] N 5000 und Heparin-Natrium 5000 ratiopharm[®] wurden unter Berücksichtigung der Beziehung 1 mg \approx 150 I. E. mit UFH 1 verglichen.

Desweiteren wurde das ebenfalls kommerziell erhältliche LMWH Enoxaparin-Natrium (Clexane[®]) getestet. Für Bindungsstudien an Melanomzellen wurde ein FITC-gelabeltes Heparin eingesetzt, welches in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. B. Casu (G. Ronzoni-Institut für Chemische und Biochemische Forschung, Mailand, Italien) synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

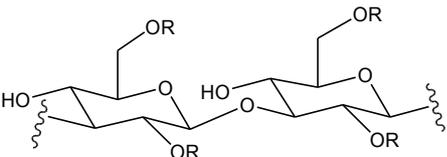
3.14.3 Phycarinsulfate (PhyS)

Die semisynthetischen linear aufgebauten Glucansulfate wurden durch Sulfatierung des Polysaccharids Phycarin erhalten. Dieser marine Naturstoff wird aus Sporophyten von *Laminaria digitata*, dem gefingerten Seetang, isoliert.

Die PhyS wurden in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. S. Alban (Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Deutschland) synthetisiert³²⁶ und freundlicherweise für die Testung zur Verfügung gestellt.

Bei dieser Substanzklasse handelt es sich um β -1,3-Glucansulfate mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von etwa 10 kD, was einem hydrodynamischen Volumen MW_{HD} von 18-19 kD entspricht. In Tab. 3-3 sind die Eigenschaften zusammengefasst.

Tab. 3-3: Phycarinsulfate

Formel	Substanz	DS	MW [kD]
 <p>R=H/SO₃Na</p>	PhyS-1	0,00	MW=10 kD für alle Verbindungen
	PhyS-2	0,75	
	PhyS-3	1,48	
	PhyS-4	1,80	
	PhyS-5	2,21	
	PhyS-6	2,80	

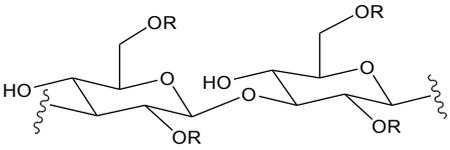
DS, „degree of sulfation“; MW, „molecular weight“; PhyS, Phycarinsulfat.

3.14.4 Curdlansulfate (CurS)

Die Curdlansulfate wurden ebenfalls in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. S. Alban (Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Deutschland) synthetisiert³²⁶. Hierbei diente das natürlich vorkommende Curdlan als Ausgangssubstanz. Curdlan wird durch Fermentation durch einen nicht-pathogenen und nicht-toxischen Stamm von *Agrobacterium biovar 1* oder *Agrobacterium radiobactor* produziert.

CurS sind wie die PhyS aus β -1,3-verknüpften Glucoseeinheiten aufgebaut. Im Gegensatz dazu haben sie jedoch ein weitaus größeres MW, was nur durch MW_{HD} charakterisiert ist. Tab. 3-4 verdeutlicht die Eigenschaften dieser Substanzklasse.

Tab. 3-4: Curdlansulfate

Formel	Substanz	DS	MW _{HD} [kD]
 R=H/SO ₃ Na	CurS-1	0,16	MW _{HD} =170 kD für CurS-1 bis CurS-4
	CurS-2	0,64	
	CurS-3	1,35	
	CurS-4	1,74	
	CurS-5	1,78	MW _{HD} =97 kD

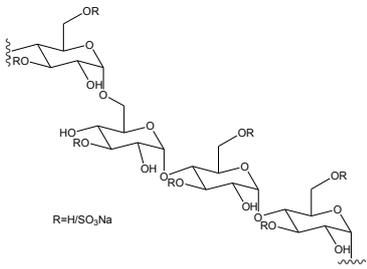
CurS, Curdlansulfat; DS, „degree of sulfation“; MW_{HD}, „molecular weight“ bestimmt als hydrodynamisches Volumen.

3.14.5 Pullulansulfate (PuIS)

Bei diesen Verbindungen handelt es sich um α -1,4/1,6-Glucansulfate. Ausgangsverbindung ist thermisch degradiertes und fraktioniertes Pullulan, ein aus Maltotrioseeinheiten bestehendes Polysaccharid. Drei Glucoseeinheiten der Maltotriose sind durch α -1,4-glykosidische Bindungen miteinander verbunden, während aufeinanderfolgende Maltotrioseeinheiten durch α -1,6-Verbindungen verknüpft sind. Pullulan wird aus Stärke durch den Pilz *Aureobasidium pullulans* produziert.

Die Synthese der sulfatierten Pullulane erfolgte in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. S. Alban (Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Deutschland)³²⁶. Das Molekulargewicht der PuIS bewegt sich im Bereich der PhyS (MW_{HD}=18-19 kD, MW=10 kD). In Tab. 3-5 sind die PuIS aufgeführt.

Tab. 3-5: Pullulansulfate

Formel	Substanz	DS	MW [kD]
 R=H/SO ₃ Na	PuIS-1	0,23	MW=10 kD für alle Verbindungen
	PuIS-2	0,58	
	PuIS-3	1,50	
	PuIS-4	2,00	

DS, „degree of sulfation“; MW, „molecular weight“; PuIS, Pullulansulfat.

3.15 *In vivo*-Testung von PhyS-4

Eine Substanz aus der Klasse der Phycarinsulfate (PhyS-4) wurde in zwei Tiermodellen durch Dr. R. J. Ludwig (Zentrum für Dermatologie und Venerologie, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt/Main, Deutschland) getestet.

Zum einen wurde PhyS-4 im Mausmodell mittels Intravitalmikroskopie hinsichtlich seines Einflusses auf die Wechselwirkung zwischen Thrombozyten und Endothel im Vergleich zu Liquemin® N 5000 untersucht. Die Methode ist ausführlich beschrieben³²⁶. Weiterhin erfolgte die Charakterisierung dieser Substanz im Rahmen der experimentellen Lungenmetastasierung von murinen B16F10-Melanomzellen³²⁷.

Die Ergebnisse beider Untersuchungen können freundlicherweise in der vorliegenden Arbeit vorgestellt werden.

3.16 Statistik

Die Werte dieser Arbeit repräsentieren Mittelwerte aus mindestens drei identischen Experimenten \pm Standardabweichung, wenn nicht anders angegeben. Signifikante Unterschiede wurden mithilfe des ungepaarten Student'schen t-Tests ermittelt oder wie gekennzeichnet. Die Signifikanzebenen sind den jeweiligen Darstellungen zu entnehmen, wobei gilt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Die Wechselwirkung von Tumorzellen mit P-Selektin

In den vorangegangenen Kapiteln konnte verdeutlicht werden, dass Adhäsionsmoleküle im Prozess der hämatogenen Metastasierung beteiligt sind. Eine besondere Bedeutung wird P-Selektin aufgrund seiner Expression auf Endothelzellen und Thrombozyten zugeschrieben. Um Einblicke in die P-Selektin-vermittelten Adhäsionsmechanismen *in vitro* zu erlangen, wurde die Wechselwirkung unterschiedlicher Tumorzellen mit P-Selektin unter statischen Bedingungen, mittels Durchflusszytometrie und unter physiologischen Flussbedingungen untersucht, wobei die Beteiligung von Thrombozyten Berücksichtigung fand. Die Ergebnisse der einzelnen Methoden sollen im folgenden vorgestellt und diskutiert werden.

4.1.1 Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Tumorzellen an P-Selektin unter statischen Bedingungen

Zunächst sollten allgemeine Aussagen über die Bindungsfähigkeit an P-Selektin erhalten werden. Aus diesem Grund wurde die Zelladhäsion unter statischen Bedingungen untersucht. Zu diesem Zweck erfolgte die Inkubation Calcein-markierter Zellen in P-Selektin-beschichteten 96er Mikrotiterplatten, die anschließend hinsichtlich ihrer Fluoreszenzwerte analysiert wurden.

Um die Qualität der Rezeptorimmobilisierung in den Mikrotiterplatten zu kontrollieren, wurde im Vorfeld die Bindungsfähigkeit eines FITC-konjugierten P-Selektin-Antikörpers bestimmt. Für diesen Zweck wurden sowohl „medium binding“- als auch „high binding“-Platten eingesetzt, um mögliche Immobilisierungsunterschiede zu detektieren. In Abb. 4-1 sind die Ergebnisse dieses Vorversuchs dargestellt, dessen detaillierte Durchführung in Kapitel 3.10.1 beschrieben ist.

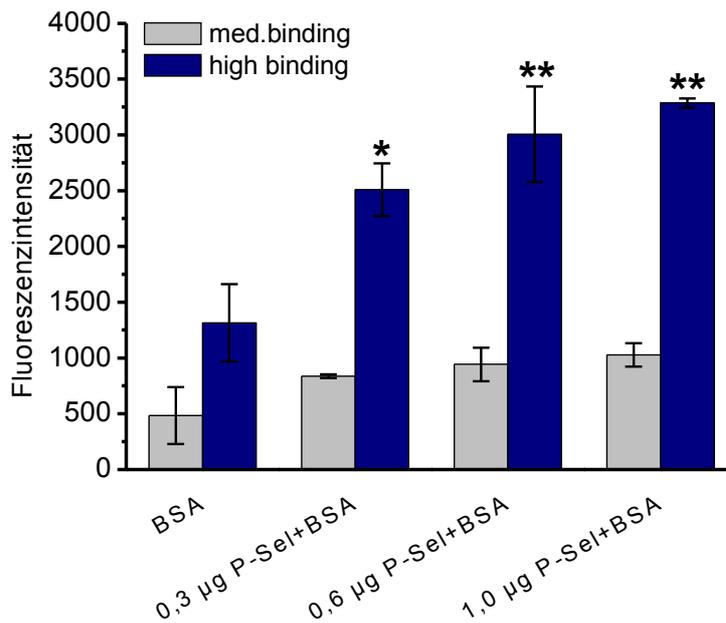


Abb. 4-1: Zugänglichkeit von immobilisiertem P-Selektin. Die Testung der Bindungsfähigkeit des FITC-konjugierten hP-Sel-Antikörpers erfolgte an unterschiedlichen hP-Selektin-Mengen und unter Verwendung von „medium binding“- und „high binding“-Mikrotiterplatten. Als Maß für die Zugänglichkeit des immobilisierten P-Selektins sind die Fluoreszenzintensitäten dargestellt. BSA, bovines Serumalbumin; P-Sel, P-Selektin.

Wie ersichtlich ist, resultiert der Einsatz der „high binding“-Mikrotiterplatte in höheren Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zur „medium binding“-Platte. Dies kann mit einer verbesserten Immobilisierung des P-Selektins erklärt werden. Weiterhin ist zu beobachten, dass eine Erhöhung der Selektinmenge eine Steigerung der Fluoreszenzintensität zur Folge hat.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Adhäsionsuntersuchungen mit humanen Melanomzellen im Vergleich zu PSGL-1-positiven myeloiden U937-Zellen unter Verwendung von „high binding“-Mikrotiterplatten gemäß Kapitel 3.10.2 durchgeführt (Abb. 4-2).

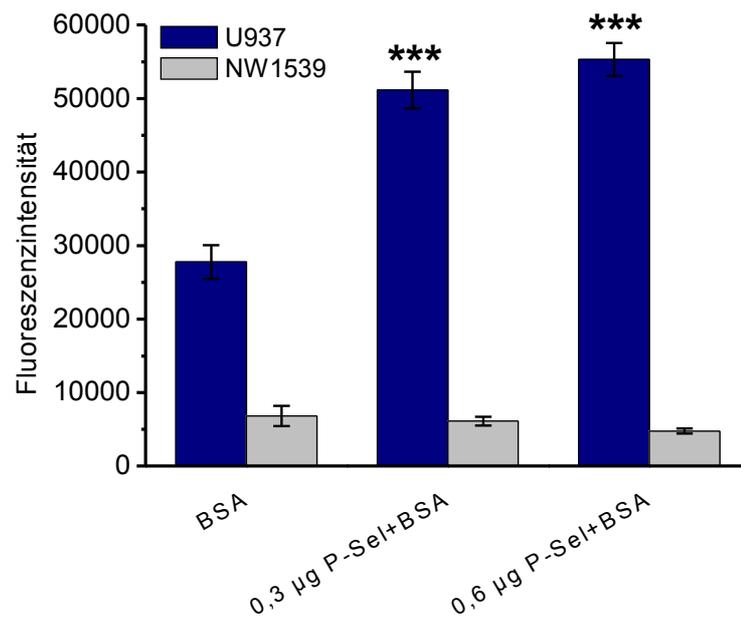


Abb. 4-2: Bindungsfähigkeit humaner Melanomzellen an P-Selektin unter statischen Bedingungen. Humane Melanomzellen NW1539 und humane myeloide Zellen U937 wurden mit Calcein markiert und in der mit hP-Selektin-beschichteten Mikrotiterplatte inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten als Maß für die Bindungsfähigkeit der Zellen an P-Selektin. BSA, bovines Serumalbumin; P-Sel, P-Selektin.

In der Abbildung wird deutlich, dass die humanen Melanomzellen NW1539 unter diesen Bedingungen keine Bindungsfähigkeit zu P-Selektin aufweisen. Im Gegensatz dazu kann für U937 bereits bei einer Menge von 0,3 µg P-Selektin eine Adhäsion beobachtet werden.

Im nächsten Schritt wurden murine Melanomzellen B16F10 in die Untersuchungen eingeschlossen und erneut mit U937 verglichen. Da im Verlauf der Arbeit die Reaktivität zwischen murinen/humanen Selektinen mit den entsprechenden humanen/murinen Selektinliganden als gesichert gelten sollte, wurde die Adhäsion beider Zelllinien sowohl an humane als auch murine P-Selektin-Fc-Chimären ermittelt (Abb. 4-3).

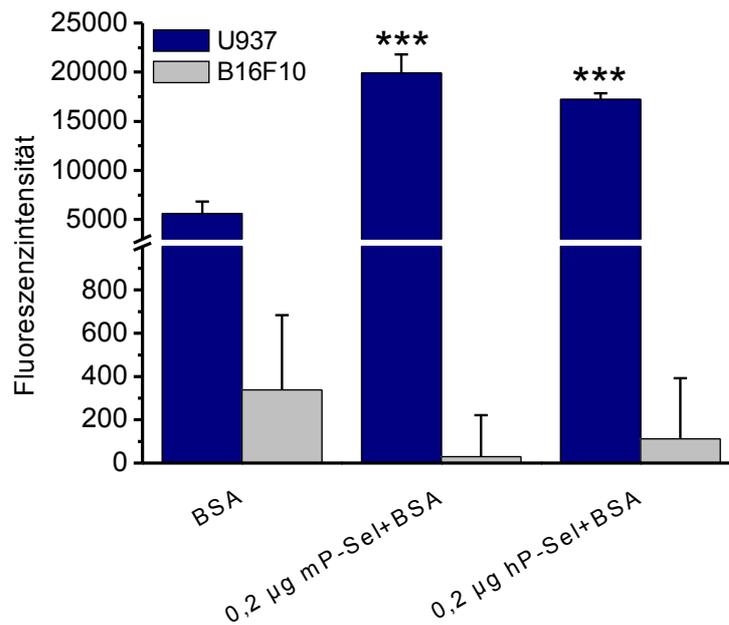


Abb. 4-3: Bindungsfähigkeit muriner Melanomzellen an P-Selektin unter statischen Bedingungen. Die Adhäsion muriner Melanomzellen B16F10 und humaner myeloider Zellen U937 wurde nach Calcein-Markierung der Zellen in der mit P-Selektin-beschichteten Mikrotiterplatte bestimmt. BSA, bovines Serumalbumin; hP-Sel, humanes P-Selektin; mP-Sel, murines P-Selektin.

Die Abbildung zeigt, dass auch die murinen Melanomzellen B16F10 nicht in der Lage sind, unter den Versuchsbedingungen an P-Selektin zu adhären. Dies steht im Gegensatz zu U937, die gleichermaßen an humane und murine P-Selektin-Fc-Chimären binden. Es ist bekannt, dass humane P-Selektin-Liganden effektiv mit murinen Selektinen und *vice versa* interagieren³²⁸, daher kann im Fall der humanen U937 eine Adhäsion an beide P-Selektin-Typen beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die untersuchten Tumorzellen unter den gewählten Bedingungen keine Bindungsfähigkeit gegenüber P-Selektin besitzen. Eine unzureichende Zugänglichkeit des immobilisierten P-Selektins kann hierbei aufgrund der vorangegangenen Untersuchung (Abb. 4-1) ausgeschlossen werden. Die fehlende Adhäsion könnte mit den Versuchsbedingungen erklärt werden. Nach der Inkubation der Zellen mit P-Selektin sind mehrere Waschschrte nötig. Aufgrund der Kinetik P-Selektin-abhängiger Bindungen könnte hierbei die Interaktion beeinflusst werden. Wie in Kapitel 2.1.3 erläutert, vermitteln Selektine die initiale Kontaktaufnahme zwischen Leukozyten und Endothelzellen. Als Folge dieser Wechselwirkung tritt ein Zellrollen entlang des Endothels ein, das nur durch eine besondere Kinetik ermöglicht werden kann. Selektin-Ligand-Bindungen weisen eine moderate Bindungsaffinität und vergleichsweise sehr hohe Assoziations- und Disso-

zationsraten auf³²⁹. Dies könnte die Interaktion anfällig für mechanische Einflüsse machen. Allerdings kann für die leukozytären U937 durchaus eine Adhäsion beobachtet werden. Diese Zellen verfügen über PSGL-1, welcher die Interaktion zu P-Selektin vermittelt. Im Kapitel 2.5.4 wurde erörtert, dass sich die Kinetiken von Leukozyten- und Tumorzell-Interaktionen mit P-Selektin deutlich voneinander unterscheiden. Es ist anzunehmen, dass die untersuchten Tumorzellen kein PSGL-1 besitzen, sondern über andere P-Selektin-Liganden verfügen.

4.1.2 PSGL-1-Expression auf Tumorzellen

Um die Zelloberflächen der Tumorzellen hinsichtlich der PSGL-1-Expression zu charakterisieren, wurden zusätzlich zu den Melanomzellen Kolon- und Leberkarzinomzellen untersucht, um eine umfassendere Aussage treffen zu können. Für diesen Zweck kam die Durchflusszytometrie zum Einsatz. In Abb. 4-4 sind die Ergebnisse illustriert.

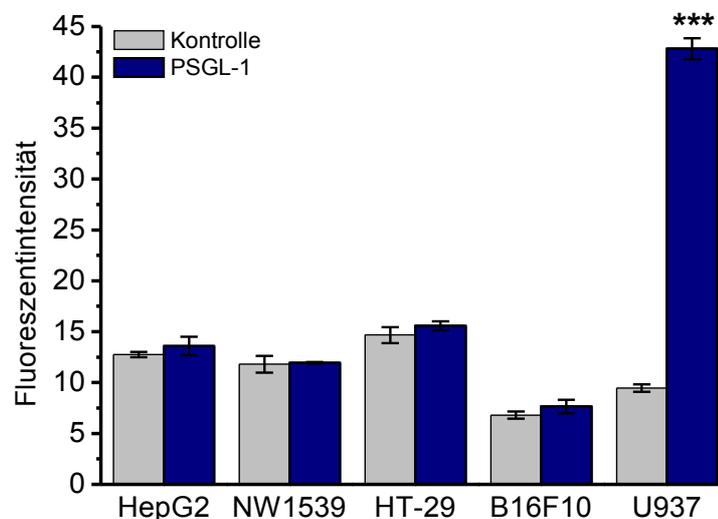


Abb. 4-4: Expression von PSGL-1 auf Tumorzellen. Die PSGL-1-Expression wurde mithilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt sind die jeweiligen Messwerte (*blau* Zellen+primärer PSGL-1-Antikörper+sekundärer FITC-konjugierter Antikörper) im Vergleich zur Kontrolle (*grau* Zellen+sekundärer FITC-konjugierter Antikörper). B16F10, murine Melanomzellen; HepG2, humane Leberkarzinomzellen; HT-29, humane Kolonkarzinomzellen; NW1539, humane Melanomzellen; PSGL-1, „P-selectin glycoprotein ligand-1“; U937, humane myeloide Zellen.

Die Abbildung verdeutlicht, dass keine der untersuchten Zellen PSGL-1 exprimiert. Für U937 konnte dagegen die in der Literatur beschriebene PSGL-1-Expression³²³ bestätigt werden. Das fehlende Vorhandensein dieses Liganden auf der Oberfläche der Tumorzellen könnte dennoch kein ausreichender Grund für die fehlende P-Selektin-Bindungs-fähigkeit sein. Wie oben erwähnt wurde, ist der Versuchsaufbau durch die anfallenden Waschschritte möglicherweise nicht geeignet, um schwache Bindungen der Tumorzellen an P-Selektin zu bestimmen.

4.1.3 Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Tumorzellen an P-Selektin mittels Durchflusszytometrie

Um zu überprüfen, ob die fehlende P-Selektin-vermittelte Adhäsion der Tumorzellen in den oben aufgeführten Experimenten auf einer prinzipiell unzulänglichen P-Selektin-Bindungs-fähigkeit beruht oder durch den Versuchsaufbau bedingt ist, wurde die Interaktion der Zellen mit P-Selektin-Fc-Chimären mittels Durchflusszytometrie untersucht. Zunächst wurde anhand der humanen Melanomzellen NW1539 die Konzentrationsabhängigkeit ermittelt, wie in Abb. 4-5 dargestellt.

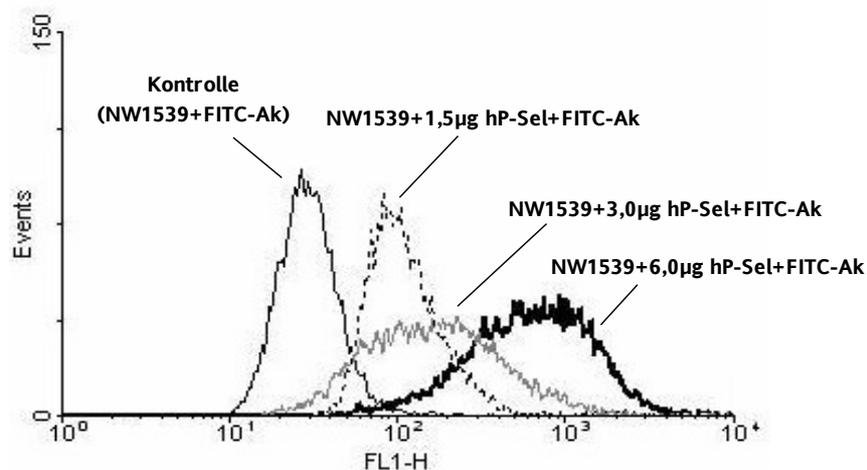


Abb. 4-5: Wechselwirkung von NW1539-Melanomzellen mit P-Selektin. Die humanen Melanomzellen der Linie NW1539 wurden mit verschiedenen Mengen an hP-Selektin-Fc-Chimären und anschließend mit einem FITC-konjugierten Antikörper inkubiert. FITC-Ak, anti-Human-IgG (Fc-spezifisch); FL1-H, Fluoreszenzintensität in Kanal 1; hP-Sel, humanes P-Selektin.

Die Abbildung zeigt, dass NW1539 in der Lage sind, mit P-Selektin in konzentrationsabhängiger Weise zu interagieren, was durch die Verschiebung der Peaks zu höheren Fluoreszenzintensitäten illustriert ist. Die Hypothese, wonach der eingangs verwendete Versuchsansatz ungeeignet zu sein scheint, konnte mit diesem Assay bestärkt werden.

Für die folgenden Versuche wurde die Bindungsfähigkeit von B16F10, HepG2, HT-29 und U937 an die jeweiligen murinen oder humanen P-Selektin-Fc-Chimären untersucht. Im Fall der B16F10 und U937 wurde erneut die Wechselwirkung mit beiden Selektintypen ermittelt. Da bereits die niedrigste Selektinmenge ein deutliches Ergebnis lieferte, wurden für die folgenden Versuche jeweils 1,5 µg P-Selektin eingesetzt (Abb. 4-6).

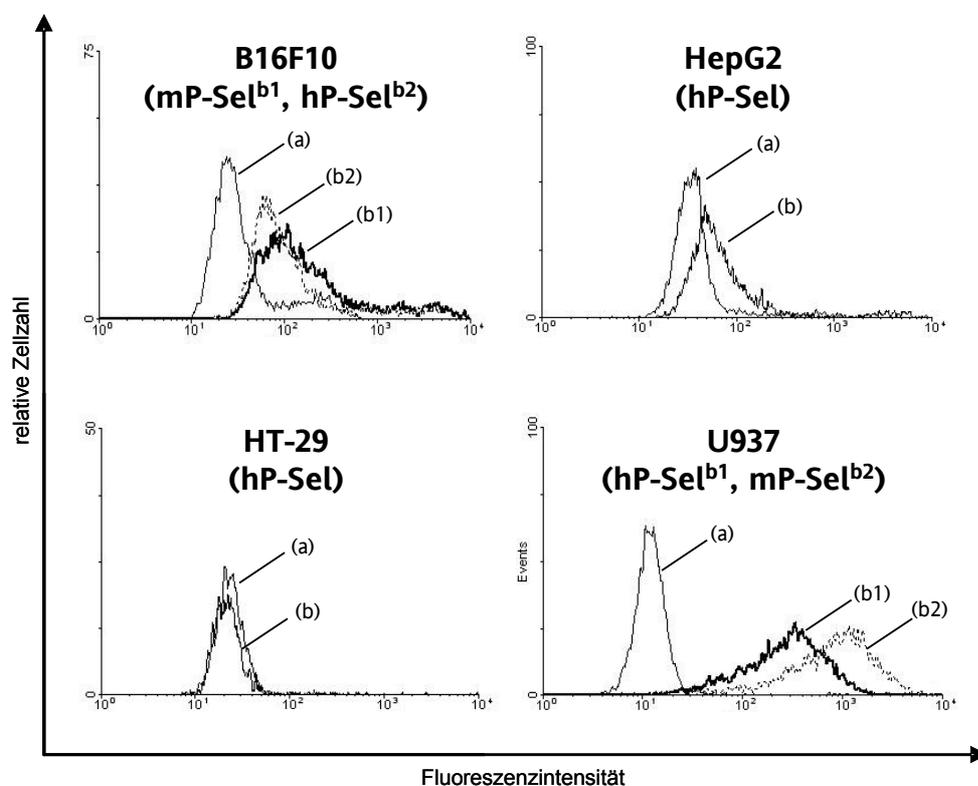


Abb. 4-6: Wechselwirkung unterschiedlicher Zellen mit P-Selektin. Die Untersuchung der Interaktion der Zellen mit P-Selektin erfolgte unter Verwendung der jeweiligen humanen oder murinen P-Selektin-Fc-Chimären. Im Fall der B16F10 wurden sowohl murine (b1) als auch humane (b2) P-Selektin-Fc-Chimären eingesetzt. In gleicher Weise erfolgte die Analyse der U937 mit dem entsprechenden humanen (b1) als auch mit murinem (b2) P-Selektin. Nach Inkubation der Zellen mit den Selektinen wurden die Proben mithilfe eines FITC-konjugierten anti-Human-IgG-Antikörpers (Fc-spezifisch) markiert. Die Peaks sind wie folgt bezeichnet: (a) Kontrolle, Zellen+FITC-Ak; (b) Zellen+P-Selektin+FITC-Ak. B16F10, murine Melanomzellen; HepG2, humane Leberkarzinomzellen; HT-29, humane Kolonkarzinomzellen; hP-Sel, humanes P-Selektin; mP-Sel, murines P-Selektin; U937, humane myeloide Zellen.

Für B16F10 und HepG2 konnte gemäß Abb. 4-6 eine Bindungsfähigkeit zum entsprechend murinen oder humanen P-Selektin ermittelt werden, wobei B16F10-Zellen eine Affinität zu beiden Selektintypen aufweisen. Die PSGL-1-positiven U937 dienten als Referenz und zeigten erwartungsgemäß eine Interaktion mit humanem P-Selektin, wobei eine stärkere Affinität zu murinem P-Selektin beobachtet werden konnte. Die Kolonkarzinomzellen HT-29 traten dagegen nicht mit P-Selektin in Wechselwirkung.

Demnach sind einige Tumorzellen trotz fehlender PSGL-1-Expression in der Lage, P-Selektin zu binden. Wie im Kapitel 2.1.2.3 erörtert, sind Moleküle mit P-Selektin-Affinität auf Tumorzellen beschrieben, zu denen beispielsweise sLe^x-haltiges CD24 auf Mamma-
karzinomzellen zählt³³⁰.

Für Melanomzellen des Typs B16F10 ist eine Bindung an P-Selektin nachgewiesen²⁹⁵. Die Liganden wurden in dieser Studie nicht näher charakterisiert. Allerdings wurden auf humanen Melanomzellen Heparansulfat-ähnliche Proteoglykane identifiziert und mit einer P-Selektin-vermittelten Adhäsion bei fehlender PSGL-1-Expression in Verbindung gebracht²⁰⁸. Ähnliche Ergebnisse wurden von Kaytes et al. erzielt. Während PSGL-1 nicht für eine P-Selektin-vermittelte Adhäsion verantwortlich gemacht werden konnte, wurde ein anderer Glykoprotein-Ligand auf humanen Melanomzellen identifiziert²¹¹. Entsprechend dieser Daten könnten B16F10 und NW1539 ähnliche P-Selektin-Liganden besitzen.

Garcia et al. wiesen 2007 nach, dass neben dem Sulfatid SM4 (HSO₃-3Galβ-1Cer, sulfatiertes Galaktosylceramid), welches auf der Kolonkarzinomzelllinie MC38 P-Selektin-abhängige Interaktionen vermittelt, auch die Sulfatide SM3 (HSO₃-3Galβ-4Glc-1Cer, sulfatiertes Laktosylceramid) und SM2 [GalNAcβ-4(HSO₃-3)Galβ-4Glcβ1-Cer, sulfatiertes Gangliotriaosylceramid] P-Selektin-Liganden darstellen. Die beiden letzteren konnten auf HepG2-Zellen nachgewiesen werden⁹⁸, was die P-Selektin-Bindung in Abb. 4-6 erklären könnte.

Für die Kolonkarzinomzellen HT-29 finden sich in der Literatur keine Hinweise auf eine P- oder L-Selektin-Affinität. Dagegen sind sowohl unter statischen²²⁷ als auch unter Flussbedingungen¹⁹¹ E-Selektin-vermittelte Wechselwirkungen beschrieben. Als entsprechender Ligand wurde C2-O-sLe^x identifiziert (s. Kapitel 2.5.3).

Demnach lassen sich die erzielten Ergebnisse, wonach einige PSGL-1-negative Tumorzellen mit P-Selektin in Wechselwirkung treten können, gut mit dokumentierten Befunden korrelieren. Da P-Selektin sowohl auf aktiviertem Endothel als auch auf aktivierten Thrombozyten exprimiert wird, ist eine Adhäsion der Tumorzellen an beide Komponenten möglich, was im folgenden vorgestellt wird.

4.1.4 Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Tumorzellen an P-Selektin unter physiologischen Flussbedingungen

Um die Adhäsion der Tumorzellen an das Endothel unter kontrollierten Flussbedingungen zu simulieren, kam die in Kapitel 3.11.3 beschriebene Durchflussapparatur zum Einsatz. Ein Vorteil dieser Methode gegenüber Versuchen unter statischen Bedingungen ist die Anpassung an physiologische Verhältnisse. Desweiteren trägt die Immobilisierung eines bestimmten Rezeptorproteins (s. Kapitel 3.11.1.2) auf den verwendeten Glaträgern zur Fokussierung auf einzelne Bindungsmechanismen bei, da die Überlappung mehrerer potentieller Adhäsionsmechanismen ausgeschlossen werden kann.

Die Tumorzellen wurden im Vergleich zu U937 getestet, die als myeloide Zellen Leukozyten-typische Rollbewegungen auf einem P-Selektin/BSA-Substrat ausführen. In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde ermittelt, welches Selektin-BSA-Verhältnis das Zellrollen mit charakteristischen Rollgeschwindigkeiten (etwa 5-20 $\mu\text{m/s}$) unterstützt^{307,331}. Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden die als optimal identifizierten Selektin-BSA-Gemische verwendet (0,2 μg entspr. 2,5 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 0,3 μg entspr. 3,75 $\mu\text{g/ml}$ P-Selektin; 0,5% (m/V) BSA). Die P-Selektin-Menge wurde im Verlauf der Arbeit an unterschiedliche Chargen U937 angepasst, wodurch der Einsatz zweier unterschiedlicher Konzentrationen zu erklären ist.

Gemäß der in Kapitel 3.11.4 geschilderten Methode wurden die Zellen nach dem Einbau des P-Selektin-haltigen Glaträgers in die Durchflussskammer gespült, in der eine fünfminütige Sedimentationsphase den Kontakt zwischen Zellen und immobilisiertem P-Selektin erlaubte. Im Anschluss wurde der Fluss gestartet und das Verhalten der Zellen aufgezeichnet und ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-7 dargestellt.

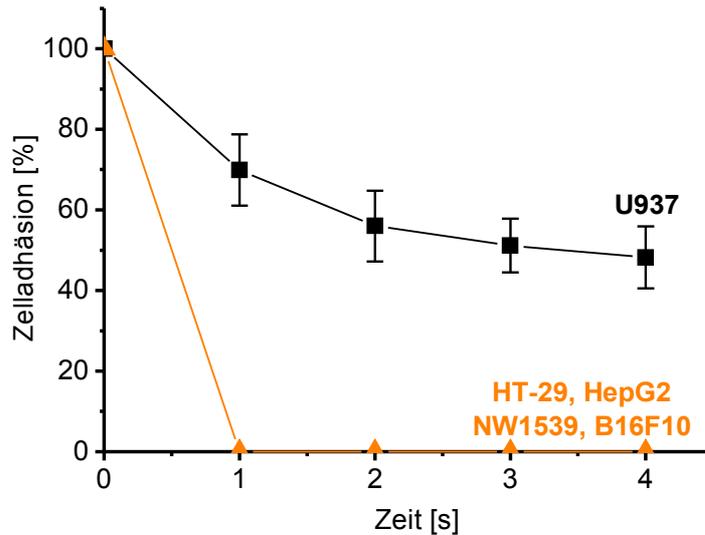


Abb. 4-7: Adhäsionsverhalten an P-Selektin unter Flussbedingungen. Humane (im Fall von HT-29, HepG2, NW1539, U937) bzw. murine (im Fall von B16F10) P-Selektin-Fc-Chimären wurden im Gemisch mit BSA auf einem Glasträger immobilisiert und in die Flusskammer eingebaut. Nach einer Sedimentationsphase wurde das Adhäsionsverhalten der Zellen ermittelt. B16F10, murine Melanomzellen; HepG2, humane Leberkarzinomzellen; HT-29, humane Kolonkarzinomzellen; NW1539, humane Melanomzellen; U937, humane myeloide Zellen.

Alle untersuchten Tumorzellen zeigten unter Flussbedingungen weder feste Adhäsion noch Rollverhalten. Mit dem Erzeugen des Flusses wurden die Zellen sofort von der Schicht gelöst. Im Gegensatz dazu rollten U937 mit Geschwindigkeiten von $17,74 \pm 3,9 \mu\text{m/s}$ entlang humaner P-Selektin-Fc-Chimären. Ein vergleichbares Verhalten der U937 konnte auf murinem P-Selektin erzielt werden ($v = 14,55 \pm 2,24 \mu\text{m/s}$), womit die Bindungsmöglichkeit humaner Selektinliganden an die entsprechenden humanen und murinen Selektine erneut demonstriert werden konnte. Die Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass für Tumorzellen eine direkte Adhäsion an das Endothel keine Voraussetzung für deren Transmigration im Rahmen der hämatogenen Metastasierung darstellt. Der Extravasationsmechanismus von Krebszellen unterscheidet sich somit von dem der Leukozyten, die initial Selektin- und nachfolgend Integrin-vermittelt direkt mit dem Endothel in Wechselwirkung treten.

Damit stehen die Resultate im Gegensatz zu einigen Befunden, die Adhäsion und/oder Rollverhalten von Tumorzellen auf P-Selektin unter Flussbedingungen dokumentieren. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass von den Tumorzellen keine Leukozyten-typischen Rollgeschwindigkeiten erreicht werden. Im Gegensatz zu parallel untersuchten PSGL-1-positiven leukozytären Zellen sind niedrigere Adhäsionsraten und bis zehnfach höhere Geschwindigkeiten zu verzeichnen, was in dem Vorliegen von P-Selektin-Liganden begründet ist, die weniger effizient Zellrollen vermitteln und sensitiver auf Scherstress

reagieren^{207-209,213}. Die Relevanz derartiger direkter Interaktionen von Tumorzellen mit dem Endothel ist fraglich und möglicherweise keine zwingende Bedingung für eine Metastasierung. Dennoch konnte *in vivo* P-Selektin-abhängiges Rollverhalten von Adenokarzinom- und Melanomzellen als Voraussetzung für eine Lungenmetastasierung definiert werden^{94,214}. Es kann demzufolge keine generelle Aussage getroffen werden. Bei entsprechender Ligandausstattung der Krebszellen ist *in vivo* eine direkte Adhäsion an das Endothel nicht auszuschließen. Allerdings ist darüber hinaus eine Beteiligung von Thrombozyten anzunehmen.

4.1.5 Wechselwirkung von Tumorzellen mit Thrombozyten

Thrombozyten exprimieren nach Aktivierung P-Selektin, wodurch eine Interaktionsmöglichkeit mit Tumorzellen gegeben ist, wenn entsprechende Liganden auf Tumorzellseite exprimiert werden. Die Effekte einer derartigen Wechselwirkung, die in einer verstärkten Metastasierung resultieren, sind in Kapitel 2.5.2 erörtert. Neben dem Schutz vor mechanischen Einflüssen besteht u. a. ein erhöhter Arrest der Tumorzellen im Gefäßsystem aufgrund der Bildung Thrombozyten-reicher Aggregate. Um zu untersuchen, ob für die zu charakterisierenden Tumorzellen eine Bindungsmöglichkeit an Thrombozyten besteht, wurden letztere zunächst hinsichtlich ihrer P-Selektin-Expression getestet. Die Abb. 4-8 stellt die P-Selektin-Expression ruhender und TRAP-14-aktivierter humaner Thrombozyten im Vergleich dar.

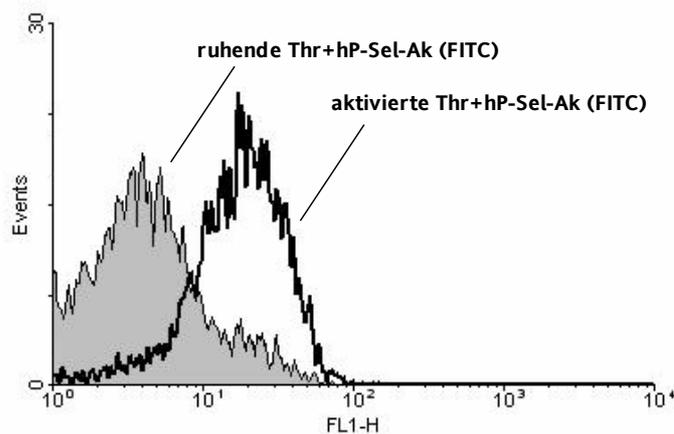


Abb. 4-8: P-Selektin-Expression auf Thrombozyten. Thrombozyten wurden aus Vollblut isoliert, zum Teil für fünf Minuten mit TRAP-14 aktiviert und mit einem FITC-konjugierten hP-Selektin-Antikörper inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenzintensität als Maß für die P-Selektin-Expression. FL1-H, Fluoreszenzintensität in Kanal 1; hP-Sel-Ak (FITC), anti-Human-CD62P (P-Selektin), FITC-konjugiert; Thr, Thrombozyten.

Wie die Abbildung verdeutlicht, nimmt die P-Selektin-Expression durch eine TRAP-14-induzierte Aktivierung der Thrombozyten zu. Bei TRAP-14 handelt es sich um ein synthetisches, aus 14 Aminosäuren aufgebautes Peptid, welches mit dem *N*-Terminus des Thrombinrezeptors PAR-1 („protease activated receptor-1“) übereinstimmt. Dieser G-Protein-gekoppelte und aus sieben transmembranären Domänen bestehende Rezeptor ist auf Thrombozyten und Endothelzellen lokalisiert. Der extrazelluläre *N*-Terminus kann zwischen Arg-41 und Ser-42 durch Thrombin gespalten werden, wodurch ein neuer *N*-Terminus exponiert wird. Dieser agiert als gebundener Ligand, indem er an eine andere transmembranäre Domäne bindet und den Rezeptor aktiviert. Synthetische Peptide (TRAPs), die den neu gebildeten *N*-Terminus imitieren, sind in der Lage, den Thrombinrezeptor ohne Spaltung zu aktivieren. Sie induzieren wie Thrombin eine Konformationsänderung, die für die Aktivierung der G-Proteine notwendig ist³³². TRAP-14 wurde als effektiv im Hinblick auf eine Thrombinrezeptor- und somit Thrombozytenaktivierung beschrieben und aus dem Grund für die Versuche eingesetzt. Mit einer fünfminütigen TRAP-14-Behandlung der Thrombozyten geht eine Translokation des in den α -Granula gespeicherten P-Selektins zur Oberfläche einher, wie in Abb. 4-8 gezeigt werden kann.

Auf der Grundlage dieser Beobachtung wurden die Tumorzellen mit ruhenden und aktivierten Calcein-markierten Thrombozyten (s. Kapitel 3.9.1) für die Dauer von fünf Minuten inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 4-9).

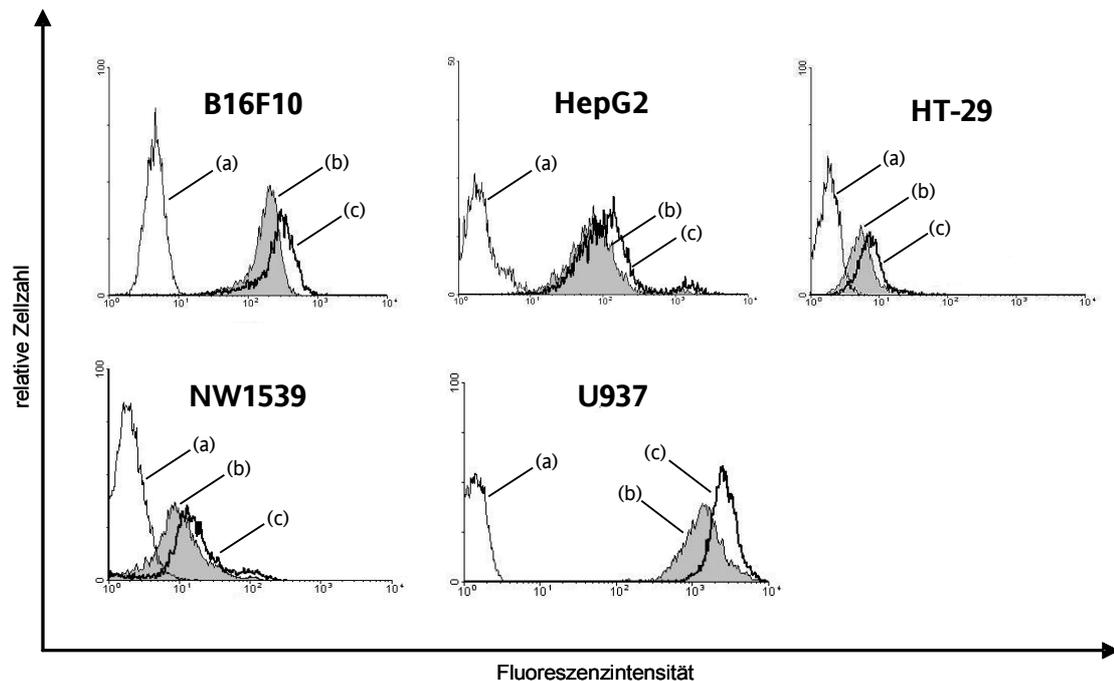


Abb. 4-9: Wechselwirkung von Zellen mit Thrombozyten. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:100 mit Calcein-markierten und zum Teil TRAP-14-aktivierten Thrombozyten für fünf Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die Peaks sind wie folgt bezeichnet: (a) Zellen; (b) Zellen+ruhende Thrombozyten; (c) Zellen+aktivierte Thrombozyten.

B16F10, murine Melanomzellen; HepG2, humane Leberkarzinomzellen; HT-29, humane Kolonkarzinomzellen; NW1539, humane Melanomzellen; U937, humane myeloide Zellen.

Gemäß Abb. 4-9 besteht bei allen untersuchten Zellen eine Wechselwirkung mit Thrombozyten. Während die Autofluoreszenz der Zellen niedrige Werte verursacht, werden diese in den Thrombozyten-haltigen Proben erhöht, was auf einer Anlagerung der Calcein-markierten Thrombozyten an die Zellen beruht. Es bestehen dabei Unterschiede zwischen ruhenden und aktivierten Thrombozyten, wobei bereits ruhende Blutplättchen hinreichend mit den Zellen interagieren. Dies könnte einerseits auf P-Selektin-unabhängigen Mechanismen beruhen. Es wäre jedoch auch denkbar, dass im Rahmen der Versuchsdurchführung eine TRAP-14-unabhängige Aktivierung, ausgelöst durch mechanische Kräfte während der Pipettiervorgänge, erfolgt. Für *in vivo*-Bedingungen ist beschrieben, dass hohe Scherkräfte Thrombozytenaktivierung und -aggregation induzieren können³³³. *In vitro* kann eine Aktivierung bereits durch die Bindung von Thrombozyten an Plastikoberflächen beobachtet werden³³⁴. Außerdem darf nicht vernachlässigt werden, dass Thrombozyten durch die Tumorzellen selbst aktiviert werden können (TCIPA, s. Kapitel 2.5.2). Somit könnte bei den Proben mit vermeintlich ruhenden Thrombozyten, bei denen P-Selektin exklusiv in den α -Granula lokalisiert sein sollte, P-Selektin durchaus (zusätzlich) auf der Oberfläche vorhanden sein.

Anhand der in Abb. 4-8 dargestellten Untersuchung konnte jedoch bestätigt werden, dass durch eine TRAP-14-Behandlung die P-Selektin-Expression weiter gesteigert werden kann. Dies korreliert mit den in Abb. 4-9 auftretenden Unterschieden zwischen ruhenden und aktivierten Thrombozyten, wodurch die Beteiligung des P-Selektins bei der Adhäsion an die Zellen anzunehmen ist. Mittels eines P-Selektin-Antikörpers wurde diese Hypothese am Beispiel der B16F10 untermauert (Abb. 4-10).

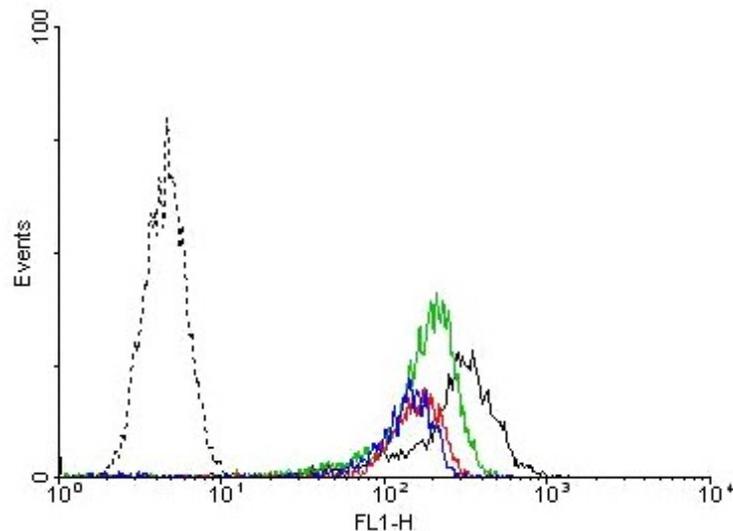


Abb. 4-10: Der Einfluss eines P-Selektin-Antikörpers auf die Tumorzell-Thrombozyt-Wechselwirkung. Melanomzellen B16F10 wurden im Verhältnis 1:100 mit ruhenden und teilweise aktivierten Calcein-markierten Thrombozyten in Anwesenheit eines hP-Selektin-Antikörpers (anti-Human-CD62P) für fünf Minuten inkubiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die Peaks sind wie folgt dargestellt: *gestrichelt* B16F10; *schwarz* B16F10+aktivierte Thrombozyten; *grün* B16F10+ruhende Thrombozyten; *rot* B16F10+aktivierte Thrombozyten+anti-Human-CD62P; *blau* B16F10+ruhende Thrombozyten+anti-Human-CD62P. FL1-H, Fluoreszenzintensität in Kanal 1.

Durch den Einsatz eines gegen humanes P-Selektin gerichteten Antikörpers wird die Bindung der Thrombozyten an die Melanomzellen gesenkt, was besonders im Fall der aktivierten Thrombozyten deutlich ausgeprägt ist. Bei ruhenden Blutplättchen tritt eine leichte Erniedrigung der Werte auf, was die geringere P-Selektin-Expression kennzeichnet. Somit kann von einer P-Selektin-vermittelten Wechselwirkung zwischen Thrombozyten und Tumorzellen ausgegangen werden.

Für HT-29 ist eine Affinität zu P-Selektin nicht anzunehmen (Abb. 4-6). Dennoch treten Wechselwirkungen mit Thrombozyten auf. Über die verantwortlichen Bindungsmechanismen kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Durch eine Aktivierung der Thrombozyten wird nicht nur P-Selektin auf der Oberfläche exprimiert. Es muss davon ausgegan-

gen werden, dass P-Selektin die beobachteten Wechselwirkungen nur teilweise vermittelt. Die Wirkung anderer Moleküle kann nicht ausgeschlossen werden. Beispielhaft sei das GPIIb/IIIa genannt, welches zu Tumorzell-Thrombozyt-Interaktionen beiträgt, wie in den Kapiteln 2.2 und 2.5.2 genannt. In seiner aktivierten Form kann es an adhäsive Glykoproteine wie Fibrinogen, vWF und Thrombospondin binden. Diese sind sowohl im Blutplasma als auch in den α -Granula ruhender Thrombozyten lokalisiert, wobei sie im Zuge der Aktivierung freigesetzt werden. Sie besitzen nicht nur Bindungsstellen für GPIIb/IIIa, sondern auch für das Integrin $\alpha V\beta 3$, welches u. a. auf Melanomzellen exprimiert wird. Wird eines oder mehrere dieser Glykoproteine sowohl von GPIIb/IIIa als auch von $\alpha V\beta 3$ erkannt, kann es eine Brückenfunktion ausüben und Tumorzell-Thrombozyt-Interaktionen fördern³³⁵. GPIIb/IIIa bindet darüber hinaus Fibrinogen-vermittelt an endotheliales ICAM-1³³⁶. Interessanterweise ist eine ICAM-1-Expression auf HT-29-Zellen¹⁹¹ und Melanomzellen²²⁹ beschrieben. Eine Adhäsion der Thrombozyten über das Bindungspaar GPIIb/IIIa-ICAM-1 könnte in diesem Fall möglich sein.

Wie sich die Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und Thrombozyten auf eine Zelladhäsion auswirkt, sollte im nächsten Schritt untersucht werden. Es ist eine Erhöhung der Adhäsion an immobilisiertes P-Selektin denkbar, da aktivierte Thrombozyten sowohl über P-Selektin als auch über PSGL-1 verfügen (s. Kapitel 2.1.2.3). Die Bindung des thrombozytären P-Selektins an Zelloberflächenstrukturen einerseits und die Interaktion des thrombozytären PSGL-1 mit dem immobilisierten P-Selektin andererseits könnte demzufolge eine Adhäsionssteigerung verursachen. Aus diesem Grund wurde der in Kapitel 4.1.4 vorgestellte Flusskammerassay in Gegenwart aktivierter Thrombozyten wiederholt und mikroskopisch beurteilt. U937-Zellen bildeten dabei entgegen ihres normalen Verhaltens Thrombozyt-vermittelt Zellaggregate aus, was durch den Einsatz eines hP-Selektin-Antikörpers gesenkt werden konnte. Die Aggregate waren zum Rollen befähigt, wie in Abb. 4-11 dargestellt ist.

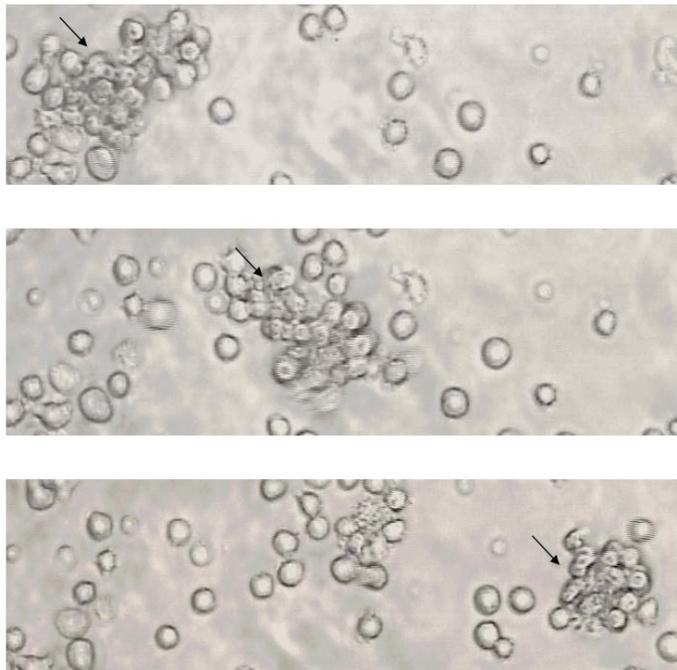


Abb. 4-11: Das Adhäsionsverhalten von U937 an P-Selektin in der Gegenwart aktivierter Thrombozyten. Nach Inkubation der U937 mit TRAP-14-aktivierten Thrombozyten im Verhältnis 1:100 wurden sie in die Durchflusskammer gespült. Nach einer Sedimentationsphase erfolgte die Aufzeichnung des Verhaltens unter Flussbedingungen. Der schwarze Pfeil markiert ein Zellaggregat, welches entlang der P-Selektin-Schicht rollt. (LD-Objektiv, 20fache Vergrößerung)

Für Leukozyten ist ein derartiges Verhalten auch unter *in vivo*-Bedingungen beschrieben. Demnach erhöhen aktivierte, nicht dagegen ruhende Thrombozyten das Leukozytenrollen in murinen Gefäßen, was einer Aggregatbildung zuzuschreiben ist³²⁵.

Im Gegensatz zu diesem Befund konnten Thrombozyten im Fall der Tumorzellen keine Adhäsion vermitteln. Sie wurden auch in ihrer Gegenwart sofort von der P-Selektin-Schicht gespült. In ähnlicher Weise kann *in vivo* keine erhöhte Adhäsion von NW1539-Melanomzellen durch Thrombozytenbeteiligung erreicht werden²¹⁴. Es ist darüber hinaus eine Wechselwirkung von bereits endothelial gebundenen Thrombozyten mit Tumorzellen beschrieben. In dem konkreten Fall wird eine feste Adhäsion von Melanomzellen vermittelt, bei der hauptsächlich $\beta 3$ -Integrine beteiligt sind. Ein P-Selektin-unterstütztes Rollen ist dagegen nicht zu beobachten³³⁵.

Zusammenfassend lassen sich folgende Aussagen zu der Wechselwirkung von Tumorzellen mit P-Selektin treffen. Während im statischen Bindungsassay keine Interaktion mit immobilisiertem P-Selektin auftritt, was möglicherweise durch den Versuchsaufbau bedingt ist, kann mittels Durchflusszytometrie eine Wechselwirkung der untersuchten Tu-

morzellen mit P-Selektin beobachtet werden. Durch die Simulierung von Adhäsionsvorgängen unter physiologischen Flussbedingungen lässt sich die primäre Beteiligung endothelialen P-Selektins ausschließen. Dagegen tritt eine P-Selektin-vermittelte Anlagerung von Thrombozyten an Tumorzellen auf, was die Adhäsion der Tumorzellen an immobilisiertes P-Selektin nicht erhöht.

Diese Befunde korrelieren mit Studien unter *in vivo*-Bedingungen, wonach v. a. thrombozytäres P-Selektin im Prozess der hämatogenen Metastasierung beteiligt ist (s. Kapitel 2.5.4). Anhand von $P^{-/-}$ -Mäusen kann die Bedeutung eindrucksvoll demonstriert werden. Während allerdings einige Autoren der Meinung sind, dass die mit der P-Selektin-Defizienz einhergehende Senkung der Metastasierung hauptsächlich auf eine Beeinflussung der Thrombozyten zurückzuführen ist^{157,222,234,337}, vermuten andere, dass besonders endotheliales P-Selektin zur Metastasierung beiträgt^{94,213,214}. Ein entscheidender Faktor dieser *in vivo*-Versuche ist der Einsatz unterschiedlicher Zelltypen. Auf der einen Seite sind die Thrombozyten von $P^{-/-}$ -Tieren nicht mehr in der Lage, an Tumorzellen zu adhären²²². In anderen Fällen ist eine derartige Abhängigkeit nicht gegeben, da sich diese Wechselwirkung in Wildtyp- und $P^{-/-}$ -Mäusen nicht voneinander unterscheidet⁹⁴ beziehungsweise bereits im Wildtyp keine Tumorzell-Thrombozyt-Interaktionen auftreten²¹⁴.

Da eine derartige Diskrepanz selbst bei dem Einsatz von Tiermodellen besteht, kann mithilfe der in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Methoden selbstverständlich keine allgemeingültige Aussage getroffen werden. Die Ergebnisse favorisieren jedoch die Beteiligung thrombozytären P-Selektins. Berücksichtigt man die Einzelschritte der hämatogenen Metastasierung, ist mit dem Eintritt der Tumorzellen in den Blutkreislauf eine sofortige Interaktionsmöglichkeit mit den zirkulierenden Thrombozyten denkbar, während eine Adhäsion an das Endothel möglicherweise erst später auftritt. Demzufolge scheint thrombozytäres P-Selektin in den frühen Schritten nach der Intravasation beteiligt, wobei die Wirkung endothelialen P-Selektins und anderer Adhäsionsmoleküle zu einem späteren Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden soll.

4.2 Die Inhibition von P-Selektin durch Heparin und semisynthetische sulfatierte Polysaccharide

Die Inhibition von P-Selektin, das in inflammatorischen Prozessen und der Metastasierung von Tumorzellen involviert ist, stellt eine Option dar, blockierend in pathologische Zustände einzugreifen. Mögliche Ansatzpunkte der Selektinhemmung wurden im Kapitel 2.6 vorgestellt. Darüber hinaus ist Heparin als P- und L-Selektin-Inhibitor beschrieben (2.7.3) und mit einer Senkung der Mortalität von Krebspatienten (2.7.2) in Zusammenhang gebracht worden. Die beobachteten positiven Effekte lassen sich zum Teil mit einer Selektinblockade erklären, wie anhand des Einsatzes von Tiermodellen aufgeklärt werden konnte (2.7.4). Allerdings erlauben *in vivo*-Methoden nur eingeschränkt Aussagen zum Einfluss einzelner Rezeptor-Ligand-Paare. Daher bieten *in vitro*-Modelle die Möglichkeit, derartige Ergebnisse zu erweitern.

Basierend auf der nachgewiesenen Bindungsfähigkeit von Heparin an P-Selektin sollten anhand von Zelladhäsionsstudien unter physiologischen Flussbedingungen Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgestellt werden³²⁶. Um eine definierte Selektin-Ligand-Interaktion betrachten zu können, wurden PSGL-1-positive U937 hinsichtlich ihres Rollverhaltens an immobilisiertem P-Selektin untersucht. Mit dem Ziel, die Selektinbindung von Heparin strukturell zu erfassen, wurden semisynthetische sulfatierte Polysaccharide in die Untersuchungen eingeschlossen. Die Durchführung und Auswertung der Experimente erfolgten gemäß Kapitel 3.11. Die hemmende Wirkung der Testsubstanzen wurde mittels hydrostatischer Methode (Kapitel 3.11.4) nach einer fünfminütigen Sedimentationsdauer der Zellen ermittelt. Dieser Versuchsaufbau resultiert zum einen in hohen Zellzahlen, zum anderen ist die Detektion des Ablösens der Zellen von P-Selektin möglich. Da selbst Polysaccharide mit geringer Polydispersität kein exakt definiertes MW besitzen, wurden die Testsubstanzen nicht bezüglich der Molarität, sondern auf Massebasis miteinander verglichen. Es kamen jeweils 5 µg, 50 µg und 500 µg zum Einsatz, die in der Flusskammer in etwa 1 ml Fließmedium verdünnt wurden. Zur Charakterisierung des inhibitorischen Potentials wurden die Parameter „Zelladhäsion“ und „Rollgeschwindigkeit“ erfasst. Die Adhäsion von U937 in Gegenwart der Substanzen wurde mit der Adhäsion im Inhibitor-freien Kontrollexperiment zu jeder Sekunde für einen Zeitraum von 0 s bis 4 s verglichen und ist prozentual als „relative Zelladhäsion“ ausgedrückt. Die Ermittlung statistisch signifikanter Unterschiede wurde jeweils für den Endpunkt des untersuchten Zeitraums durchgeführt. Die Rollgeschwindigkeit in Anwesenheit eines Inhibitors änderte sich besonders innerhalb der

ersten Sekunde verglichen mit dem Kontrollversuch und wird demzufolge für diesen Zeitraum als prozentuale Änderung der Rollgeschwindigkeit dargestellt.

4.2.1 Die Inhibition der Zelladhäsion durch Heparine

Um zu bestimmen, in welchem Ausmaß Heparin die Zellbindung in diesem Assay inhibiert, wurden vier Heparine (UFH 1, MMWH, LMWH und VLMWH; s. Tab. 3-2, S. 95) mit unterschiedlichem Molekulargewicht im Bereich von 15,0 kD (UFH 1) bis 3,4 kD (VLMWH) untersucht. Da alle fraktionierten Heparine vom selben unfraktionierten Heparin (UFH 1) degradiert wurden, sind sie in allen anderen strukturellen Parametern wie beispielsweise funktionellen Gruppen vergleichbar. Der ermittelte Sulfatierungsgrad nach Fraktionierung ist bei allen Heparinen identisch ($DS=1,20$) und entspricht einem DS von 2,40 pro Heparindisaccharideinheit. Zusätzlich wurden die beiden kommerziell erhältlichen unfraktionierten Heparine Liquemin[®] N 5000 und Heparin-Natrium 5000 ratiopharm[®] getestet. Für Vergleichszwecke wurde Fucoidan mit einem MW von 8,2 kD und einem DS von etwa 1,6 als etablierter Inhibitor mit einer sulfatierten Polysaccharidstruktur untersucht²⁹⁸.

Wie oben erwähnt, wurden die Testsubstanzen aufgrund der Polydispersität auf der Basis ihrer Massen miteinander verglichen. Bezüglich der Heparine ist zu erwähnen, dass darüber hinaus kein Zusammenhang zwischen der P-Selektin-Bindung des Heparins und seiner antikoagulatorischen Aktivität besteht, weshalb die klinisch gebräuchliche Angabe von Internationalen Einheiten mithilfe der Beziehung $1 \text{ mg} \approx 150 \text{ I. E.}$ durch Massenwerte ersetzt wurde. Abb. 4-12 stellt die Ergebnisse der Untersuchungen dar.

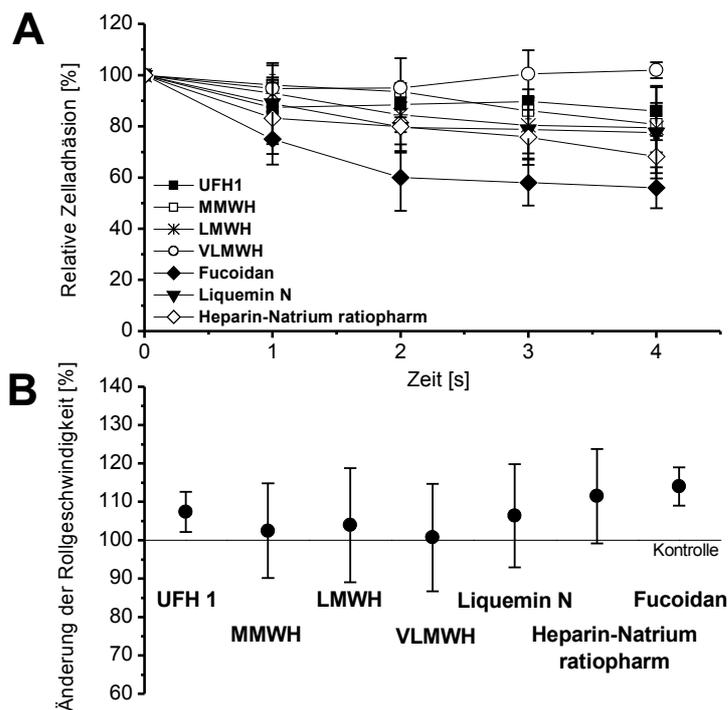


Abb. 4-12: P-Selektin-Inhibierungspotential von Heparinen und Fucoïdan. **A** Dargestellt ist der Einfluss von Heparinen und Fucoïdan (50 µg/ml) auf den zeitlichen Verlauf der Adhäsion von U937. Die Daten von LMWH und Liquemin® N ($p < 0,05$), MMWH ($p < 0,01$) sowie Heparin-Natrium ratiopharm® und Fucoïdan ($p < 0,001$) sind zum Zeitpunkt $t = 4$ s statistisch signifikant verschieden vom Kontrollversuch. **B** Die Änderung der Zellrollgeschwindigkeit nimmt mit steigender Inhibierungskapazität innerhalb der ersten Sekunde zu. LMWH, „low molecular weight heparin“; MMWH, „medium molecular weight heparin“; UFH 1, unfraktioniertes Heparin; VLMWH, „very low molecular weight heparin“.

In Abb. 4-12A ist ersichtlich, dass Fucoïdan die Zelladhäsion auf $56,0 \pm 8,1\%$ reduziert und die Heparinaktivität übertrifft, was mit früheren Befunden übereinstimmt²⁹⁸. Die beiden kommerziell erhältlichen Produkte Liquemin® N 5000 und Heparin-Natrium 5000 ratiopharm® senken die Zellbindung auf $77,5 \pm 17,8\%$ bzw. $68,2 \pm 6,4\%$. Sie sind dem UFH 1 überlegen, das die Adhäsion nur auf $86,0 \pm 9,8\%$ erniedrigt, was mit den fraktionierten Heparinen MMWH und LMWH vergleichbar ist. Da VLMWH mit einem MW von 3,4 kD ineffektiv ist, kann angenommen werden, dass eine bestimmte minimale Größe für eine Selektininhibition notwendig ist. Dieses Ergebnis lässt sich mit beschriebenen Untersuchungen vergleichen, die das MW als kritischen Parameter für die P-Selektin-Hemmung definieren³⁰². Die beobachteten Unterschiede zwischen den drei UFHs verdeutlichen, dass Heparine nicht geeignet sind, um exakte Struktur-Wirkungsbeziehungen aufzustellen. Zehnfach höhere Mengen sind nicht in der Lage, die Aktivitäten der entsprechenden He-

parine signifikant zu erhöhen, wobei die in Abb. 4-12A dargestellten Relationen erhalten bleiben (Daten nicht gezeigt). Dagegen zeigt der Einsatz von 5 µg/ml einen kompletten Verlust der Effektivität. Diese nichtlineare Abhängigkeit der Selektinbindung von der Konzentration konnte auch in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe nachgewiesen werden³⁰⁷, was wahrscheinlich einer multivalenten Bindung der polymeren Heparinstrukturen zuzuschreiben ist.

Das Inhibierungspotential der Testsubstanzen wurde zusätzlich durch die Erhöhung der Rollgeschwindigkeiten, mit der sich U937 auf der P-Selektin-Schicht fortbewegen, charakterisiert (Abb. 4-12B). Während alle Heparine deren Geschwindigkeit nur leicht erhöhen, verursachen die beiden aktivsten Substanzen Heparin-Natrium 5000 ratiopharm® und Fucoidan eine Steigerung auf $111,5 \pm 12,3\%$ beziehungsweise $114,0 \pm 5,1\%$.

Berücksichtigt man die bessere Wirksamkeit von Fucoidan (MW=8,2 kD) verglichen mit LMWH (MW=6,0 kD) und MMWH (MW=10,5 kD), wird die Relevanz des Molekulargewichts im Hinblick auf die Inhibierungsfähigkeit im Verhältnis zu anderen Parametern wie der Kohlenhydratgrundstruktur und dem Sulfatierungsgrad fraglich.

Da Heparine mit ihrer variablen und komplexen Struktur ungeeignet sind, um Struktur-Wirkungsbeziehungen zu ermitteln, wurden nachfolgend semisynthetische Glucansulfate mit definierter chemischer Zusammensetzung eingesetzt. Ihre Testung hatte zum Ziel, weitere strukturelle Parameter mit Einfluss auf die P-Selektin-Inhibition zu identifizieren.

4.2.2 Der Einfluss des Sulfatierungsgrades auf die P-Selektin-Inhibition

Der natürliche P-Selektin-Ligand PSGL-1 enthält drei sulfatierte Tyrosine, die in negativ geladenen Clustern angeordnet sind (s. Kapitel 2.1.2.3). Demzufolge könnte ein höherer DS mit einer besseren Inhibition einhergehen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde eine Serie aus sechs Phycarinsulfaten (PhyS; β -1,3-Glucansulfate) untersucht, die sich bei identischem MW von 10 kD, im Bereich zwischen LMWH und MMWH liegend, nur in ihrem DS voneinander unterscheiden und dabei Werte von 0,00 bis 2,80 annehmen (PhyS-1 bis PhyS-6; s. Tab. 3-3, S. 96). In Abb. 4-13 ist die Korrelation zwischen DS und P-Selektin-Inhibition dargestellt.

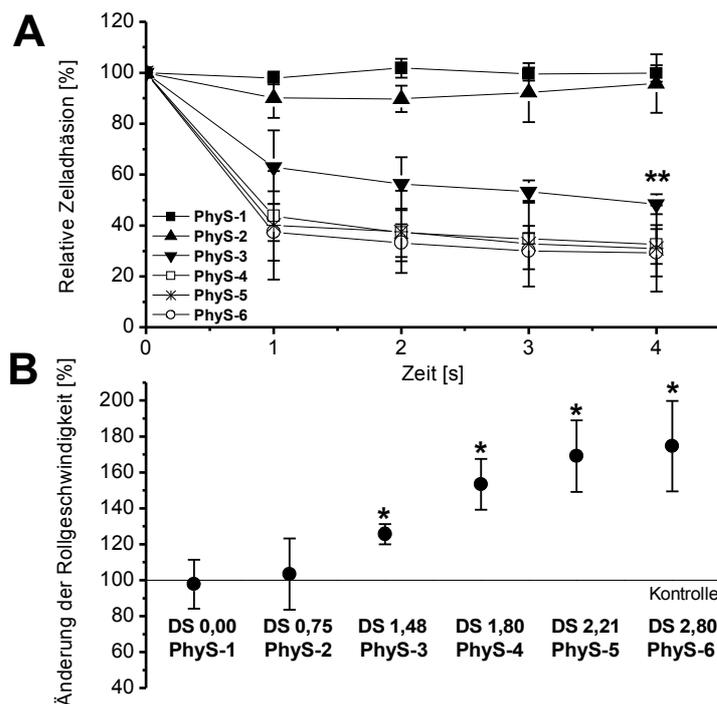


Abb. 4-13: P-Selektin-Inhibierungspotential von Phycarinsulfaten.

A Dargestellt ist der Einfluss von Phycarinsulfaten (50 µg/ml) auf den zeitlichen Verlauf der Adhäsion von U937. Die Daten von PhyS-3 bis PhyS-6 zum Zeitpunkt $t=4$ s sind statistisch signifikant verschieden vom Kontrollversuch. **B** Die Änderung der Zellrollgeschwindigkeit nimmt mit steigender Inhibierungskapazität innerhalb der ersten Sekunde zu, wobei signifikante Unterschiede ab PhyS-3 im Vergleich zum Kontrollversuch erreicht werden. DS, Sulfatierungsgrad; PhyS, Phycarinsulfat.

Die Abb. 4-13A illustriert das Adhäsionsverhalten von U937 über den angegebenen Zeitraum. Es kann eine deutliche Abhängigkeit der Inhibierungskapazität vom DS festgestellt werden. Während das unsulfatierte PhyS-1 (DS=0,00) und das gering sulfatierte Derivat PhyS-2 (DS=0,75) gegenüber P-Selektin keine Hemmung aufweisen, zeigen Substanzen mit einem $DS \geq 1,5$ eine viel stärkere Aktivität als LMWH und MMWH. PhyS-4 mit einem DS von 1,80 reduziert die Zelladhäsion auf $32,6 \pm 7,6\%$. Eine weitere Zunahme des DS bis 2,80 verbessert die Selektinhemmung nicht. Die Korrelation zwischen DS und Inhibierungspotential wird auch im Hinblick auf die Rollgeschwindigkeiten deutlich (Abb. 4-13B). Der Anstieg der Werte ist gut mit den Effekten auf die Zelladhäsion in Abb. 4-13A vergleichbar, wobei die Geschwindigkeiten in Gegenwart von Heparin-Natrium 5000 ratiopharm® und Fucoidan stark übertroffen werden (Abb. 4-12B).

Der bedeutende Einfluss der Ladungsdichte auf die P-Selektin-Inhibition konnte auch durch die Testung einer Pullulansulfat-Reihe (PuS) verdeutlicht werden. Diese α -1,4/1,6-Glucansulfate haben ein identisches MW wie die PhyS und zeigen eine graduelle Zunahme

me des DS von 0,23 bis 2,00 (PulS-1 bis PulS-4; s. Tab. 3-5, S. 97). Wie in der Abb. 4-14 dargestellt, stellen sich PulS-1 und PulS-2 mit einem DS < 1,00 als inaktiv heraus. In Analogie zu den Befunden der PhyS, müssen PulS einen bestimmten DS überschreiten, um P-Selektin-inhibierende Eigenschaften zu entfalten (DS=1,50 für PulS-3; DS=2,00 für PulS-4).

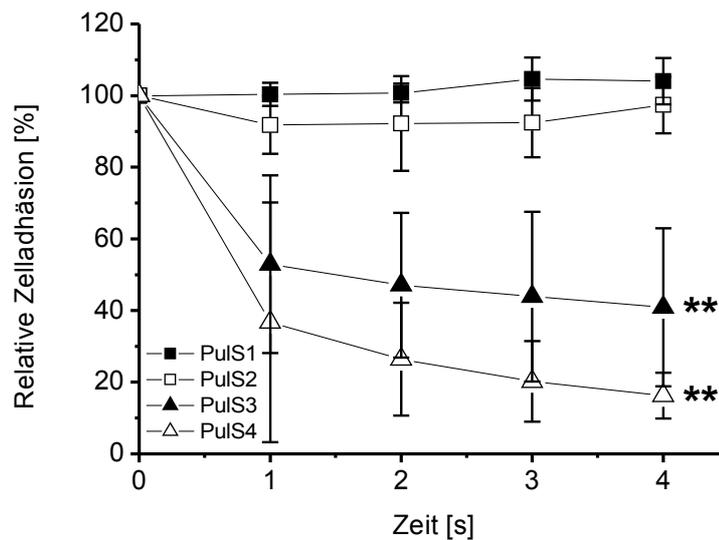


Abb. 4-14: P-Selektin-Inhibierungspotential von Pullulansulfaten. Dargestellt ist der Einfluss von Pullulansulfaten (50 µg/ml) auf den zeitlichen Verlauf der Adhäsion von U937. Die Daten von PulS-3 und PulS-4 zum Zeitpunkt t=4 s sind statistisch signifikant verschieden vom Kontrollversuch. PulS, Pullulansulfat.

Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass sulfatierte Polysaccharide mit einem den Heparinen vergleichbaren MW (<15 kD) einen bestimmten minimalen DS aufweisen müssen, um P-Selektin effektiv zu blockieren. Ein höherer DS verbessert die Aktivität und scheint mit Werten von 1,80 bis 2,00 ein Maximum zu erreichen. Fucoidan mit einem DS von etwa 1,6 lässt sich gut mit den erhaltenen Resultaten vergleichen, da es eine ähnliche Aktivität wie PhyS-3 (DS=1,48) und PulS-3 (DS=1,50) zeigt.

Obwohl in Betracht gezogen werden muss, dass der DS der semisynthetischen Polysaccharide aufgrund der zusätzlich enthaltenen Carboxylgruppen in Heparin nicht direkt mit dessen Ladungsdichte verglichen werden kann, scheint die Ladung zu der stärkeren P-Selektin-Hemmung von Fucoidan und Glucansulfaten im Vergleich zu Heparin beizutragen.

4.2.3 Der Einfluss des Molekulargewichtes auf die P-Selektin-Inhibition

Die Resultate der von UFH 1 abgeleiteten Heparine lassen einen nichtlinearen Einfluss des Molekulargewichtes auf die Selektinbindungskapazität vermuten. Um auf den Beitrag der Molekülgröße zu fokussieren, wurde die Aktivität von β -1,3-Glucansulfaten mit ähnlichem DS von etwa 1,8, aber unterschiedlichem MW_{HD} untersucht. Dazu wurden aus der Reihe der Curdlansulfate (CurS; β -1,3-Glucansulfate) zwei Vertreter ausgewählt. CurS-4 (MW_{HD} =170 kD) und CurS-5 (MW_{HD} =97 kD) wurden mit PhyS-4 (MW_{HD} =19 kD) verglichen, wie in Abb. 4-15A dargestellt.

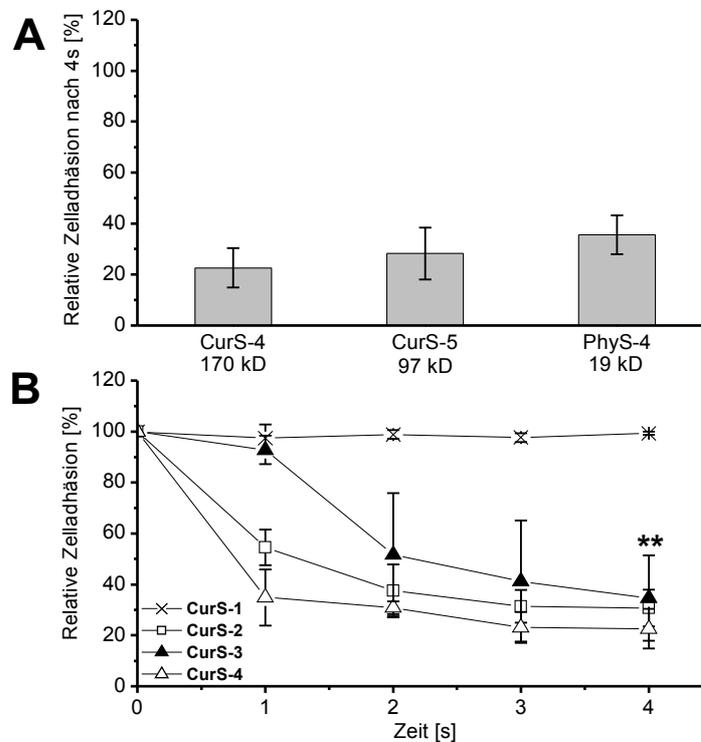


Abb. 4-15: P-Selektin-Inhibierungspotential von Curdlansulfaten. **A** Um den Einfluss des Molekulargewichtes von β -1,3-Glucansulfaten auf die P-Selektin-Inhibition zu ermitteln, wurden drei Derivate mit einem DS von etwa 1,8 und dem angegebenen MW miteinander verglichen. **B** Dargestellt ist der Einfluss unterschiedlicher Curdlansulfate (50 μ g/ml) auf den zeitlichen Verlauf der Adhäsion von U937. Die Daten von CurS-2 bis CurS-4 zum Zeitpunkt t=4 s sind statistisch signifikant verschieden vom Kontrollversuch. CurS, Curdlansulfat; PhyS, Phycarinsulfat.

Es wird ersichtlich, dass die drei Derivate CurS-4, CurS-5 und PhyS-4 die Zelladhäsion stark senken, was im Gegensatz zu der relativ schwachen Wirkung von UFH 1 ($MW_{HD}=28$ kD) steht (Abb. 4-12A). Diesem Ergebnis zufolge kann angenommen werden, dass das MW, solange es ein kritisches Minimum überschreitet, wie anhand VLMWH gezeigt, nur einen untergeordneten Einfluss auf die P-Selektin-Hemmung von Substanzen mit hinreichend großem DS ausübt.

Die geringere Aktivität der drei UFHs im Vergleich zu den Glucansulfaten kann nicht mit dem MW, sondern vielmehr mit dem Einfluss des Kohlenhydratgrundgerüsts und/oder den Ladungseigenschaften erklärt werden. Um die kombinierte Wirkung von MW und DS zu bestimmen, wurde die komplette Serie der CurS, die sich im DS voneinander unterscheiden (CurS-1 bis CurS-4; DS 0,16-1,78; s. Tab. 3-4, S. 97) untersucht und mit den Effekten von PhyS und PulS verglichen. Die inhibitorische Kapazität der verschiedenen CurS ist in Abb. 4-15B dargestellt. Wie bei PhyS und PulS festzustellen, nimmt die Inhibierungsfähigkeit mit steigendem DS zu. Nur das niedrig sulfatierte CurS-1 (DS=0,16) ist unwirksam, während die anderen Derivate etwa gleich effektiv sind. Im Gegensatz zu den Glucansulfaten mit geringem MW ist der kritische Schwellenwert des DS bei den hochmolekularen CurS viel niedriger. Bereits mit einem Wert von 0,64 wird eine gute P-Selektin-Blockade erreicht. Dies könnte mit einem bestimmten Gleichgewicht aus lokaler Ladungsdichte und Gesamtladung erklärt werden. Die PhyS organisieren sich womöglich in geordneterer Art und Weise auf der P-Selektin-Schicht als für die großen CurS der Fall. Deren konformative Anordnung könnte zu einer höheren lokalen Ladungsdichte bei niedrigerer Sulfatierung pro Monomer (DS) führen. Daher scheint bei Glucansulfaten ein höheres MW einen kleineren DS zu kompensieren. Dies führt zu der Vermutung, dass der DS weniger wichtig ist als die totale Anzahl negativer Ladungen, die P-Selektin präsentiert wird.

4.2.4 Der Einfluss des Kohlenhydratgrundgerüsts auf die P-Selektin-Inhibition

Die bisher vorgestellten Ergebnisse zum Einfluss von MW und DS können dennoch nicht vollständig die geringe Aktivität der getesteten Heparine erklären. Zusätzliche strukturelle Parameter spielen wahrscheinlich eine Rolle bei der optimalen Präsentation negativ geladener Reste. Diese Annahme sollte mit dem Vergleich der Aktivitäten von Substanzen der PhyS- und PulS-Serie überprüft werden. Sie haben ein identisches MW und decken einen vergleichbaren DS-Bereich ab, unterscheiden sich jedoch in der Art der gly-

kosidischen Verknüpfung der Glucoseeinheiten voneinander. In PhyS sind die Monomere in β -1,3-glykosidischer Form verbunden, wogegen PulS α -1,4/1,6-Glucane mit α -1,6-verbundenen Maltotrioseeinheiten darstellen. In Abb. 4-16 ist die Inhibition der Zelladhäsion in Abhängigkeit des DS dargestellt, wobei MMWH mit vergleichbarer Größe berücksichtigt ist.

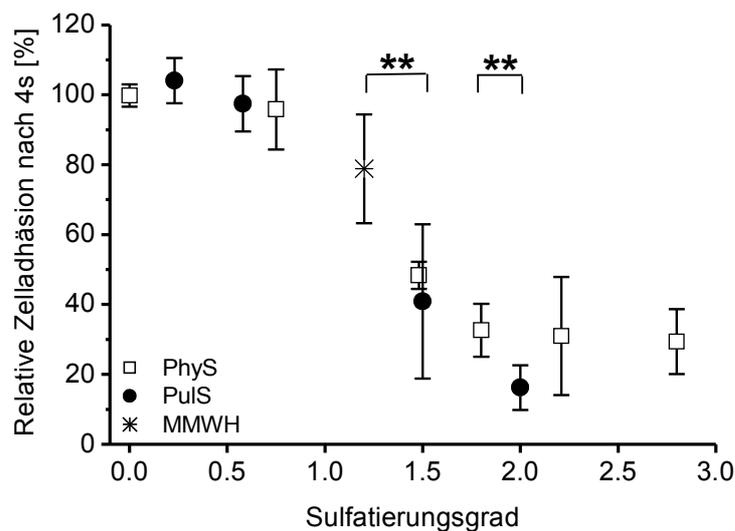


Abb. 4-16: P-Selektin-Inhibition in Abhängigkeit des Sulfatierungsgrades. Dargestellt sind die relativen Zelladhäsionen zum Zeitpunkt $t=4$ s in Gegenwart von Phycarinsulfaten, Pullulansulfaten und MMWH in Abhängigkeit des Sulfatierungsgrades bei gleichem Molekulargewicht. Signifikante Unterschiede bestehen zwischen den jeweils vergleichbar sulfatierten Substanzen MMWH und PulS-3 und zwischen PhyS-4 und PulS-4. MMWH, „medium molecular weight heparin“; PhyS, Phycarinsulfat; PulS, Pullulansulfat.

Anhand der Abbildung wird erneut deutlich, dass PhyS und PulS mit einem $DS < 1,0$ inaktiv sind. Allerdings besteht ein signifikanter Unterschied zwischen PhyS-4 und PulS-4, obwohl sie einen vergleichbaren DS besitzen. Dieses Resultat demonstriert den Einfluss des Kohlenhydratgrundgerüsts auf die P-Selektin-Inhibition. Dies kann auch durch den Vergleich von MMWH mit PulS-3 verdeutlicht werden. Diese Substanzen weisen eine identische Größe und vergleichbaren DS auf, unterscheiden sich jedoch signifikant in ihrem Inhibierungspotential voneinander. Es ist anzunehmen, dass die Art der Polysaccharidstruktur einen weiteren Parameter für die P-Selektin-Inhibition darstellt. Die Derivate der PulS-Reihe sind aufgrund der α -1,4/1,6-glykosidischen Verknüpfung flexibler als Heparin und PhyS, wodurch sich eine bessere lokale Präsentation der Ladungsträger ergibt.

4.2.5 Die *in vivo*-Aktivität eines ausgewählten Phycarinsulfates und Heparins bei P-Selektin-abhängigen Interaktionen

Um zu untersuchen, ob die *in vitro* beobachtete P-Selektin-Inhibition durch Glucansulfate von klinischer Bedeutung sein könnte, wurde ein Vertreter aus der Reihe der Phycarinsulfate (PhyS-4) ausgewählt und hinsichtlich seines Einflusses auf P-Selektin-abhängiges Thrombozytenrollen getestet. Zu diesem Zweck wurden humane aktivierte Thrombozyten in das Gefäßsystem von Mäusen injiziert und ihr Verhalten mittels Intravitalmikroskopie in Gegenwart von PhyS-4, Liquemin® N 5000 oder eines P-Selektin-Antikörpers analysiert³²⁶. Die Versuche entstanden in Kooperation mit Dr. R. J. Ludwig (Zentrum für Dermatologie und Venerologie, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt/Main, Deutschland), deren Ergebnisse freundlicherweise in dieser Arbeit vorgestellt werden können. Im Gegensatz zu Leukozytenrollen, bei dem alle drei Selektintypen involviert sind, erlaubt das Modell des Thrombozytenrollens die Fokussierung auf P-Selektin. In normalen murinen Hautgefäßen wird P-Selektin konstitutiv exprimiert³³⁸. Da eine Erkennung muriner P-Selektin-Liganden durch humane Selektine und *vice versa* gegeben ist, ist anzunehmen, dass eine Blockade des P-Selektins die Interaktionen von Thrombozyten mit dem Gefäßendothel reduziert. In der Tat senkt ein P-Selektin-Antikörper die Fraktion rollender Thrombozyten auf $57.5 \pm 11.67\%$ im Vergleich zu einem Kontrollantikörper (Abb. 4-17B). Dies beweist die Beteiligung von P-Selektin bei diesem Prozess, obwohl die nur zum Teil eintretende Inhibition auf die Wirkung anderer Adhäsionsmoleküle hindeutet. Dass GPIIb/IIIa einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Adhäsion von Thrombozyten ausübt, wurde bereits mehrfach erwähnt. Die Überlappung mit diesem und ggf. anderen Bindungswegen muss angenommen werden. Dennoch ist das Modell geeignet, um die Effekte der Testsubstanzen *in vivo* zu ermitteln.

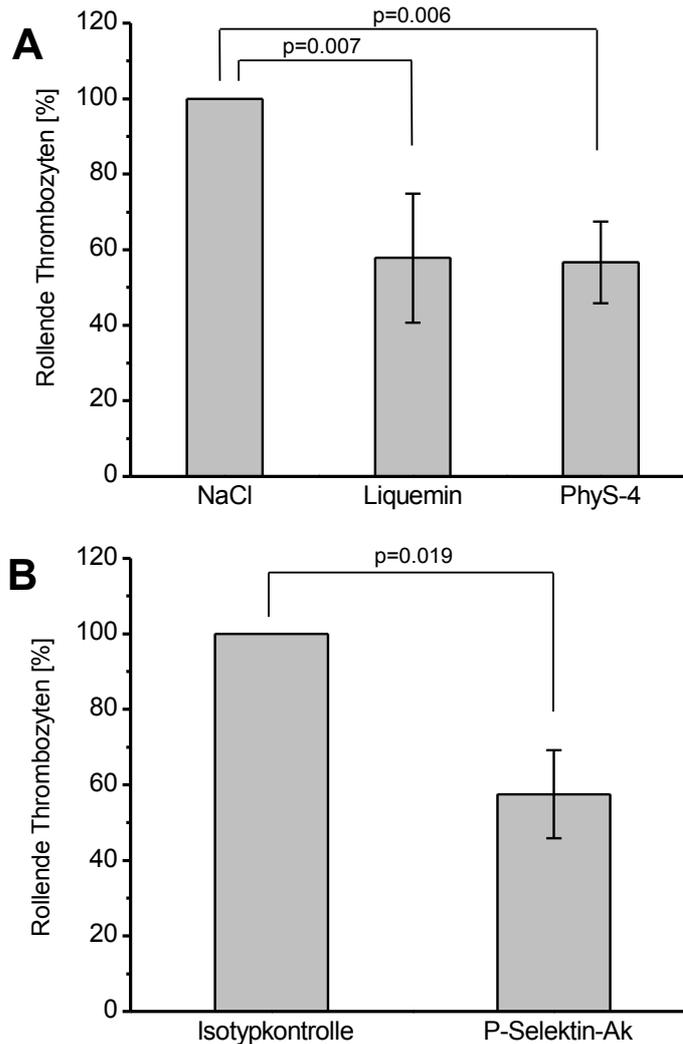


Abb. 4-17: Intravitalmikroskopische Untersuchung der P-Selektin-abhängigen Interaktion von fluoreszenzmarkierten Thrombozyten mit dem Endothel. A TRAP-14-aktivierte Thrombozyten wurden in der Gegenwart von Liquemin® N 5000 oder PhyS-4 (25 mg/kg Körpergewicht) im Vergleich zu 0,9% NaCl hinsichtlich ihres Rollverhaltens getestet. **B** Dargestellt ist der Einfluss eines P-Selektin-Antikörpers im Vergleich zu einem Kontrollantikörper (2 mg/kg Körpergewicht) auf das Thrombozytenrollen.

Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler (mindestens sechs Gefäße von mindestens drei Mäusen). Die Vergleiche wurden mittels des gepaarten Student'schen t-Tests durchgeführt. PhyS-4, Phycarinsulfat-4.

Der Abb. 4-17A kann entnommen werden, dass PhyS-4 in Relation zum Kontrollexperiment (0,9% NaCl) die Fraktion rollender Thrombozyten auf $56,67 \pm 10,83\%$ senkt, was vergleichbar mit der Aktivität des P-Selektin-Antikörpers ist (Abb. 4-17B). Überraschenderweise zeigt Liquemin® N 5000 in diesem Assay eine ähnlich ausgeprägte Wirksamkeit, was im Gegensatz zu dem Ergebnis des *in vitro*-Versuchs steht. Möglicherweise ist die Sensitivität des *in vivo*-Modells aufgrund der anzunehmenden Überlappung verschiedener

Adhäsionsmechanismen relativ gering. Dies zeigt erneut, dass die Kombination mit *in vitro*-Untersuchungen eine sinnvolle Ergänzung darstellt. Obwohl bei dem *in vivo*-Versuch die P-Selektin-Beteiligung nachgewiesen ist, korreliert dessen Inhibition nicht ausreichend mit der gesenkten Anzahl an Thrombozytenkontakten. Das könnte der Grund sein, warum Substanzen mit unterschiedlichen *in vitro*-Aktivitäten ähnliche Effekte *in vivo* ergeben. Da PhyS-4 und Liquemin® N 5000 ein vergleichbares Inhibierungspotential wie der P-Selektin-Antikörper zeigen, kann vermutet werden, dass bereits eine bestimmte P-Selektin-Inhibierungskapazität ausreicht, um einen maximalen Effekt bei der P-Selektin-Beteiligung im Prozess des Thrombozytenrollens zu erzielen.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass sowohl Heparin als auch Glucansulfate aktive P-Selektin-Inhibitoren sind, wobei die Wirksamkeit der neuartigen Glucansulfate auch unter *in vivo*-Bedingungen relevant ist.

Die angestellten Betrachtungen können wie folgt zusammengefasst werden. Bezüglich der Untersuchungen an verschiedenen Heparinderivaten lässt sich schlussfolgern, dass eine bestimmte Minimalgröße nötig ist, um P-Selektin-inhibierende Eigenschaften aufzuweisen, was mit Befunden von König et al. übereinstimmt³⁰². Die zwei kommerziell erhältlichen Heparine zeigen eine moderate Bindungsaffinität, wogegen UFH 1 und davon abgeleitete Substanzen (LMWH, MMWH) relativ schwach wirksam sind. Dies verdeutlicht den Einfluss von Produktunterschieden auf die Selektininhibition und die Notwendigkeit der Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen. Im Gegensatz zu den getesteten Heparinen zeigen einige Glucansulfate eine deutlich ausgeprägte Inhibierungsfähigkeit, was anhand der strukturellen Eigenschaften erklärt werden kann.

Die Heparinfraktionen wurden vom selben Ausgangsprodukt erhalten, zeigen demzufolge identische strukturelle Parameter und unterscheiden sich nur in ihrer Größe voneinander. Die vergleichbaren Aktivitäten von UFH 1, MMWH und LMWH lassen vermuten, dass das MW von untergeordneter Bedeutung hinsichtlich der P-Selektin-Inhibition ist. Das wird durch die Effekte der semisynthetischen Glucansulfate bestätigt. Da die Substanzen der PhyS- und CurS-Reihe, die sich um den Faktor 10 in ihrem MW voneinander unterscheiden, gleich wirksam sind, kann das Molekulargewicht die den Heparinen überlegenen Aktivitäten der Glucansulfate nicht erklären.

Die Ladungsdichte dagegen kann als dominanter Parameter betrachtet werden, wobei eine direkte Korrelation zwischen DS und Inhibierungspotential ermittelt werden konnte. Dabei übt das MW modulierende Einflüsse auf die Ladung aus, indem Substanzen mit hohem MW bereits bei niedrigem DS gute Inhibierungseigenschaften zeigen. Dies hängt

wahrscheinlich mit der Möglichkeit zusammen, lokal eine hohe Anzahl an Sulfatgruppen zu arrangieren, auch wenn der DS vergleichsweise gering ist. Nimmt der DS Werte von $>1,5$ an, geht dies mit einer optimalen P-Selektin-Inhibition einher. Demzufolge sind die Heparine mit einem DS von 1,20 nicht ausreichend sulfatiert. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass deren Ladungsdichte zusätzlich durch die Carboxylgruppen erhöht wird und die für die Selektinbindung kritische Ladungsdichte übertrifft. Daher kann dieser Faktor die viel geringer ausgeprägte Selektininhibition der Heparine nicht erklären.

Die glykosidische Verknüpfung der Monomere, die die Flexibilität der Polymere beeinflusst, hat ebenfalls einen starken Effekt auf die P-Selektin-Hemmung. In dem Zusammenhang sind flexible Polysaccharide mit identischer Monomerstruktur offensichtlich effektiver, wie für die PuS ermittelt werden konnte. Dies trifft auch für die Bindung des natürlichen Liganden PSGL-1 zu⁸¹. Damit könnte die Überlegenheit der PuS über die PhyS erklärt werden. Heparin zeigt eine vergleichsweise schwache P-Selektin-Inhibition, was nicht nur durch seine Molekülgröße und Ladungsdichte erklärt werden kann. Zu welchem Ausmaß die Monomere, deren Verknüpfung und resultierende Flexibilität von Heparin zu der niedrigeren Aktivität als die der Glucansulfate und Fucoidan (Fucose) beiträgt, kann an dieser Stelle jedoch nicht ermittelt werden.

Die Glucansulfate ermöglichen klare strukturelle Korrelationen und weisen eine exzellente P-Selektin-Inhibition auf. Im Gegensatz zu Heparin sind sie wenig antikoagulatorisch aktiv³³⁹ und erscheinen daher als attraktive Arzneistoffe. Ihr Einsatz bietet die Möglichkeit der Beeinflussung pathologischer Selektin-vermittelter Zustände unter Vermeidung Heparin-bedingter Nebenwirkungen. Derartige Ziele sind auch mit der Modifikation des Heparingerüsts erreichbar, wie in Kapitel 2.7.3 vorgestellt wurde. Allerdings können dadurch andere Nachteile wie beispielsweise Produktvariabilität nicht beseitigt werden.

Mit dem Ziel einer potentiellen Therapieoption wurde PhyS-4 im Vergleich zu Lique-min[®] N 5000 zusätzlich in einem *in vivo*-Modell getestet. In diesem Assay konnte kein Unterschied zwischen beiden Testsubstanzen detektiert werden, was mit der Überlappung mehrerer Bindungsprozesse erklärt werden kann. Es wird allerdings deutlich, dass PhyS-4 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* P-Selektin-hemmende Eigenschaften aufweist. Desweiteren ist Heparin trotz vergleichsweise niedriger *in vitro*-Aktivität als effektiver P-Selektin-Inhibitor unter *in vivo*-Bedingungen anzusehen. Bei dem klinischen Einsatz von Heparin sind darüber hinaus weitere biologische Funktionen anzunehmen, wie in den Kapiteln 2.7.4 und 2.7.5 beschrieben.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass mittels QCM-Technik („quartz crystal microbalance“) tiefere Einblicke in Selektin-vermittelte Wechselwirkungen möglich sind, da Informationen über die zugrunde liegende Kinetik erhalten werden können. In unserer Arbeitsgruppe wurden im Rahmen der Dissertation von Herrn Dirk Simonis Heparine und PhyS hinsichtlich ihrer Bindungsparameter (k_{on} , k_{off} , K_D) an P-Selektin untersucht und mit den oben vorgestellten Inhibierungspotentialen verglichen. Es konnte u. a. gezeigt werden, dass die Inhibierungsfähigkeit (Senkung der Zelladhäsion) exzellent mit k_{off} korreliert ($R=0,99$), während k_{on} die Aktivität des Inhibitors zu einem geringeren Ausmaß beeinflusst ($R=0,67$). Demzufolge scheint die Dissoziation einer Substanz von P-Selektin, die viel langsamer als die des Liganden PSGL-1 abläuft, ausschlaggebend für deren hemmende Wirkung zu sein³²⁹.

Hinsichtlich der Möglichkeit, Struktur-Wirkungsbeziehungen aufzustellen, sind die getesteten semisynthetischen sulfatierten Polysaccharide als potentielle Arzneistoffkandidaten zu bezeichnen, die Heparin für bestimmte klinische Anwendungen ersetzen könnten, in denen pathologische P-Selektin-vermittelte Prozesse involviert sind.

4.3 Charakterisierung des Phycarinsulfates PhyS-4

4.3.1 Die *in vivo*-Aktivität von PhyS-4 im Rahmen der experimentellen Lungenmetastasierung von Melanomzellen

Wie im Kapitel 2.7.4 aufgeführt, senkt Heparin Selektin-abhängig die Metastasierung. Demzufolge ist diese Wirkung auch durch die Anwendung der semisynthetischen Glucan-sulfate denkbar. Basierend auf der nachgewiesenen *in vitro* und *in vivo*-Aktivität des Phycarinsulfates PhyS-4 wurde diese Substanz im Mausmodell der experimentellen Lungenmetastasierung von murinen B16F10-Melanomzellen durch Dr. R. J. Ludwig (Zentrum für Dermatologie und Venerologie, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt/Main, Deutschland) getestet³²⁷. Das Ergebnis ist in Abb. 4-18 dargestellt.

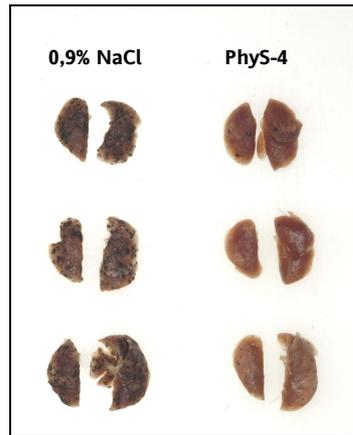


Abb. 4-18: Der Einfluss von PhyS-4 auf die experimentelle Lungenmetastasierung von B16F10-Melanomzellen. PhyS-4 (20 mg/kg Körpergewicht) bzw. 0,9% NaCl wurden i. v. 30 Minuten vor Inokulation von $3 \cdot 10^5$ B16F10-Zellen in Mäuse injiziert. Nach elf Tagen erfolgten die Entnahme der Lungen und die Bestimmung der Anzahl metastatischer Läsionen, wie in früheren Untersuchungen beschrieben²¹⁴.
PhyS-4, Phycarinsulfat-4.

In Abb. 4-18 wird ersichtlich, dass PhyS-4 eine deutliche Reduktion der Metastasierung bewirkt. Während die Tiere der Kontrollgruppe eine große Anzahl an Lungenmetastasen aufweisen, ist diese in der Verumgruppe drastisch reduziert. Der Mechanismus der PhyS-4-Wirkung ist aufgrund der in den Kapiteln 4.2.2 und 4.2.5 vorgestellten Resultate durch die Inhibition P-Selektin-abhängiger Wechselwirkungen erklärbar. Es wäre allerdings auch möglich, dass PhyS-4 darüber hinaus andere Prozesse beeinflusst. Um weitere Einblicke in die PhyS-4-Aktivität zu erlangen, kamen nachfolgend verschiedene *in vitro*-Methoden zum Einsatz, deren Ergebnisse in den nächsten Kapiteln vorgestellt werden sollen.

4.3.2 Weiterführende *in vitro*-Untersuchungen der Selektininhibition durch PhyS-4

Im Rahmen der in Kapitel 4.2.2 vorgestellten Experimente konnte PhyS-4 als potenter P-Selektin-Inhibitor identifiziert werden. Dabei fand die hydrostatische Methode Verwendung. Um auszuschließen, dass das Inhibierungspotential primär durch den Versuchsaufbau bedingt ist, sollte die P-Selektin-Inhibition erneut unter Flussbedingungen untersucht werden, wobei ein Rundlaufsystem eingesetzt wurde. Die erhaltenen Ergebnisse wurden um die Untersuchungen E- und L-Selektin-vermittelter Adhäsionsereignisse erweitert. Zu-

nächst wurden anhand des Verhaltens PSGL-1-positiver U937-Zellen und mit E-Selektin-transfizierter CHO-Zellen (E-CHO, s. Kapitel 3.7.3) definierte Selektin-Ligand-Interaktionen betrachtet.

In dem Rundlaufsystem werden die Zellen mittels Pumpe in einem kontinuierlichen Fluss über die Modellschicht gespült. In ähnlicher Weise wie für die Nutzung der hydrostatischen Methode bewirkt die Zugabe eines Inhibitors eine Senkung der Anzahl rollender Zellen. Das Verhältnis aus Zellanzahl vor und nach Substanzzugabe beschreibt demzufolge die Inhibition des jeweiligen Selektins. Im Kapitel 3.11.4 ist die genaue Durchführung erläutert. Für die Untersuchungen an P-Selektin (0,2 µg) wurden erneut U937-Zellen eingesetzt und deren Rollverhalten vor und nach PhyS-4-Zugabe analysiert. Eine Immobilisierung von E-Selektin (0,2 µg und 0,4 µg) konnte kein Rollen der U937 erzielen. Es traten unspezifische Adhäsionsereignisse auf, die mit den Untersuchungen an P-Selektin in keiner Weise vergleichbar waren. Die etwa 50fach geringere Affinität des PSGL-1 zu E- als zu P-Selektin (s. Kapitel 2.1.2.3) könnte dieses Phänomen in dem Assay erklären. Aus diesem Grund musste ein anderes Rezeptor-Ligand-Paar eingesetzt werden. Bekannterweise bindet sLe^x E-Selektin³⁴⁰. Daher wurde eine Modellmembran mit dem Liganden sLe^xLac1 erzeugt (s. Kapitel 3.11.1.3), der das Rollen E-Selektin-positiver E-CHO-Zellen unterstützt³⁷. Mithilfe dieser Versuchsanordnung konnte der PhyS-4-Einfluss untersucht werden. In Abb. 4-19 sind die Ergebnisse für P- und E-Selektin dargestellt.

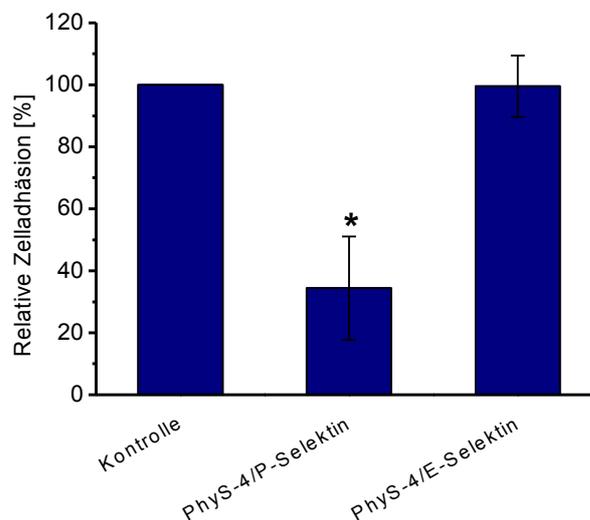


Abb. 4-19: Der Einfluss von PhyS-4 auf die P- und E-Selektin-vermittelte Zelladhäsion.

Die Ermittlung der P-Selektin-Inhibition erfolgte anhand der Wechselwirkung PSGL-1-positiver U937 mit immobilisiertem P-Selektin. Um den PhyS-4-Einfluss auf E-Selektin zu bestimmen, wurde die Adhäsion E-Selektin-positiver E-CHO an einer sLe^x-haltigen Modellmembran betrachtet. Es wurden jeweils 250 µg PhyS-4 eingesetzt, die in etwa 2,5 ml Fließmedium verdünnt wurden.

Die Abbildung macht deutlich, dass auch mit diesem modifizierten Versuchsaufbau eine P-Selektin-Blockade erreicht wird, wobei sich die Werte zwischen hydrostatischer Methode und Rundlaufsystem minimal voneinander unterscheiden ($32.59 \pm 7.59\%$ bei $t=4$ s vs. $34.36 \pm 16.65\%$ nach fünf Minuten). Die eingangs ermittelte P-Selektin-Inhibierungsfähigkeit konnte somit bestätigt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die bereits nach vier Sekunden eintretende Inhibition im weiteren Zeitverlauf annähernd gleich bleibt und nicht abhängig vom betrachteten Zeitpunkt ist. Desweiteren ist eine Konzentrationserhöhung von $50 \mu\text{g/ml}$ (s. Kapitel 4.2.2) auf $100 \mu\text{g/ml}$ nicht mit einer Steigerung der Aktivität verbunden, was erneut die nichtlineare Abhängigkeit der Selektinbindung von der Konzentration dokumentiert. Im Gegensatz dazu weist PhyS-4 keine E-Selektin-inhibierenden Eigenschaften auf ($99.54 \pm 9.90\%$).

Dieselbe Versuchsanordnung sollte für die Untersuchung des PhyS-4-Einflusses auf die Wechselwirkung von U937 mit immobilisiertem L-Selektin ($0,2 \mu\text{g}$) verwendet werden. Da PSGL-1 in der Lage ist, auch an L-Selektin zu binden, kann eine Interaktion angenommen werden. Interessanterweise erwies sich der Einsatz des Rundlaufsystems als ungeeignet. Die Zellen waren nicht fähig, aus dem Fluss heraus an L-Selektin zu binden. Dies könnte mit dem strukturellen Aufbau des Rezeptors erklärt werden. Im Gegensatz zu dem langgestreckten, aus neun SCRs bestehenden P-Selektin, weist L-Selektin nur zwei dieser Struktureinheiten auf. Möglicherweise sind die Wechselwirkungen nicht weitreichend genug, um einen Kontakt zwischen zellulärem PSGL-1 und immobilisiertem L-Selektin zu ermöglichen. Schließt man die *in vivo*-Gegebenheiten in die Betrachtungen ein, wird deutlich, dass die Initiierung des Leukozytenrollens durch P-Selektin vermittelt wird. Unter *in vivo*-Bedingungen ist eine frühe Beteiligung von L-Selektin dadurch gegeben, dass es auf den Spitzen der Mikrovilli exprimiert wird und somit trotz der geringen räumlichen Ausdehnung gut zugänglich ist. Diese Art der exponierten L-Selektin-Präsentation ist in dem Flusskammerassay nicht gewährleistet, weshalb ein L-Selektin-vermitteltes Rollen der U937 im Rundlaufsystem nicht eintritt. Aus diesem Grund kam erneut die hydrostatische Methode zum Einsatz. Im Gegensatz zu den im Rundfluss vorherrschenden Bedingungen ermöglicht die Sedimentationsphase den initialen Kontakt zwischen Zellen und immobilisiertem Rezeptorprotein. Mithilfe dieser Methode konnte Zellrollen der U937 auf L-Selektin erreicht und somit die Inhibition durch PhyS-4 untersucht werden (Abb. 4-20).

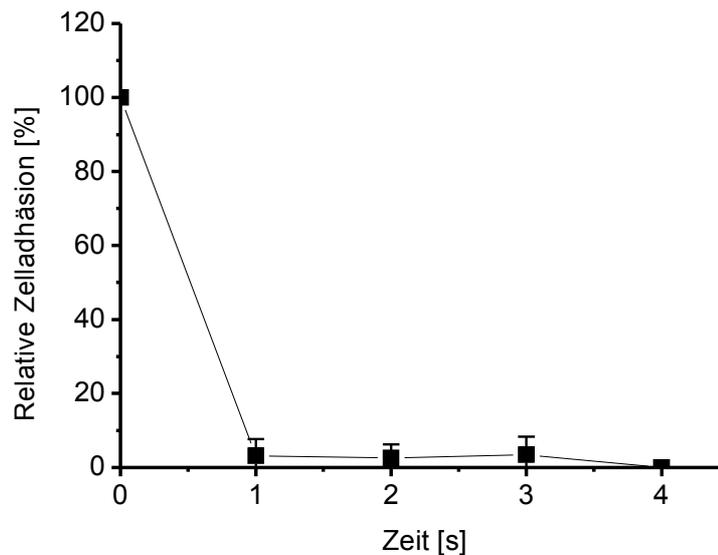


Abb. 4-20: Inhibierung L-Selektin-vermittelter Zelladhäsion durch PhyS-4. Die Ermittlung der L-Selektin-Inhibition erfolgte anhand der Wechselwirkung von U937 mit immobilisiertem L-Selektin. Es wurden 250 μg PhyS-4 eingesetzt, die in etwa 2,5 ml Fließmedium verdünnt wurden.

Wie aus der Abbildung ersichtlich, hemmt PhyS-4 das Zellrollen in großem Ausmaß. Während im Kontrollexperiment ein Rollen der U937 beobachtet werden kann, verursacht PhyS-4 ein fast vollständiges Ablösen der Zellen vom L-Selektin-Substrat.

Darüber hinaus konnte im Kontrollversuch ein schnelleres Rollen der U937 beobachtet werden ($>20 \mu\text{m/s}$) als für P-Selektin-vermittelte Interaktionen der Fall. Möglicherweise ist dafür die schnellere Kinetik des L-Selektins im Vergleich zu P- und E-Selektin verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion von Neutrophilen auf vergleichbaren E- und P-Selektin- bzw. CD34-Mengen durch identische Bindungsstärken, jedoch unterschiedliche Rollgeschwindigkeiten gekennzeichnet ist, wobei eine größere Geschwindigkeit auf dem L-Selektin-Liganden CD34 erreicht wurde³⁴¹. Obwohl in diesem Assay ein anderes Bindungspaar betrachtet wurde, könnte eine Übertragung auf die Untersuchungen der U937 an immobilisiertem L-Selektin möglich sein und somit der Erklärung des schnellen Rollens dienen.

Eine vergleichbar starke Inhibition des L-Selektins durch PhyS-4 konnte auch anhand der Rolluntersuchungen von PBMCs („peripheral blood mononuclear cells“) auf einem biotinylierten Polyacrylamid mit 20 mol% sLe^x und 5 mol% sulfatiertem Tyrosin ermittelt werden, der starke Ähnlichkeit mit natürlichen L-Selektin-Liganden aufweist³⁴².

Wie bereits in statischen Zelladhäsionsassays beobachtet werden konnte³³⁹, inhibiert PhyS-4 P- und L-Selektin-abhängige Wechselwirkungen, wogegen E-Selektin nicht gehemmt wird. Diese Resultate stimmen mit den Befunden für Heparin überein, das in glei-

cher Weise P- und L-Selektin, nicht dagegen E-Selektin blockiert (s. Kapitel 2.7.3). Heparin und Phys-4 erfüllen als sulfatierte Polysaccharide vergleichbare strukturelle Voraussetzungen wie die natürlichen P- und L-Selektin-Liganden (s. Kapitel 2.1.2.3 und 2.1.2.2). Im Gegensatz dazu ist eine Ladungsabhängigkeit für E-Selektin-vermittelte Wechselwirkungen nicht gegeben (s. Kapitel 2.1.2.1).

Mit den beschriebenen Versuchen konnte die Selektininhibition von Phys-4 an jedem Selektin einzeln charakterisiert werden. Desweiteren wurde im Mausmodell eine Phys-4-abhängige Senkung der Lungenmetastasierung von murinen B16F10-Melanomzellen beobachtet. Um das Metastasierungsverhalten dieser Zellen *in vitro* zu ermitteln, erfolgten bereits orientierende Untersuchungen. Bisher konnte für B16F10 eine Bindungsfähigkeit an P-Selektin (s. Kapitel 4.1.3) sowie an Thrombozyten (s. Kapitel 4.1.5) mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Um weitere Aussagen zu erhalten, wurde die Interaktion von B16F10 mit allen Selektinen betrachtet, wobei die Durchflusszytometrie erneut Einsatz fand. Das Ergebnis ist in Abb. 4-21 illustriert.

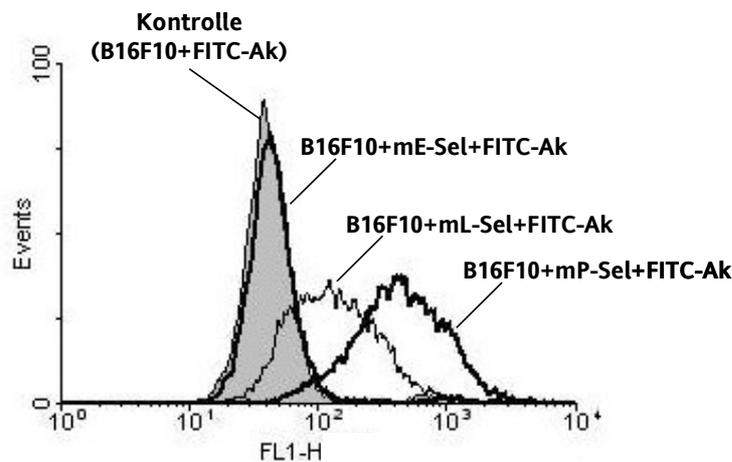


Abb. 4-21: Wechselwirkung von B16F10-Melanomzellen mit E-, L- und P-Selektin. Die murinen Melanomzellen der Linie B16F10 wurden mit je 2,0 µg mE-, mL- und mP-Selektin-Fc-Chimären und anschließend mit einem sekundären FITC-konjugierten Antikörper inkubiert. Als Kontrolle dienten Proben, die nur B16F10 und den sekundären Antikörper enthielten (*grau*). FITC-Ak, anti-Human-IgG (Fc-spezifisch); FL1-H, Fluoreszenzintensität in Kanal 1, mE-Sel, murines E-Selektin; mL-Sel, murines L-Selektin; mP-Sel, murines P-Selektin.

Die Abbildung bestätigt die P-Selektin-Bindungsfähigkeit der B16F10, wobei zusätzlich eine geringer ausgeprägte Interaktion mit L-Selektin auftritt, was mit beschriebenen Befunden übereinstimmt²⁹⁵. Eine Adhäsion der Zellen an E-Selektin kann dagegen nicht festgestellt werden. In der Literatur ist eine E-Selektin-abhängige Bindung und damit einher-

gehende Metastasierung von B16-Zellen zu beobachten, wenn diese mit α -1,3-Fucosyltransferase III transfiziert sind, was eine erhöhte sLe^x-Expression verursacht^{197,343}. Da gemäß Abb. 4-21 keine E-Selektin-Affinität vorliegt, kann davon ausgegangen werden, dass die untersuchten B16F10 kein oder nicht ausreichend sLe^x exprimieren. Dieses Ergebnis führt erneut zu der Annahme, dass eine Selektin-vermittelte Adhäsion am Endothel keine essentielle Voraussetzung für den Metastasierungsprozess darstellt. Die Bedeutung der beobachteten Wechselwirkung der Zellen mit P-Selektin wurde bereits in den Kapiteln 4.1.4 und 4.1.5 diskutiert. Die Bindungsfähigkeit der B16F10 an L-Selektin lässt auf eine Leukozytenbeteiligung schließen. Wie im Kapitel 2.5.5 erläutert, sind in Abhängigkeit von der Leukozytenart metastasierungsfördernde Effekte denkbar. Dabei wird eine temporäre Induktion *Fut7*-abhängiger endogener L-Selektin-Liganden angenommen, was eine Extravasation der Tumorzellen begünstigt²³³. Für diesen Fall ist eine direkte Interaktion zwischen Leukozyten und Tumorzellen nicht erforderlich, was *in vivo* durch die Ummantelung mit Thrombozyten vermutlich verhindert wird. Der Versuch wurde in Abwesenheit von Thrombozyten durchgeführt. Somit ist die Oberfläche der B16F10 für L-Selektin zugänglich. Es wäre durchaus möglich, dass Thrombozyten diese direkte Wechselwirkung blockieren. Allerdings zeigt das Ergebnis, dass eine prinzipielle L-Selektin-Bindung besteht, wodurch *in vivo* eine Interaktion von B16F10 mit Leukozyten an jenen Stellen angenommen werden kann, die nur zum Teil von Thrombozyten bedeckt sind.

Um den Einfluss von PhyS-4 auf die beobachteten Selektinbindungen zu untersuchen, wurde die Substanz mit den jeweiligen Selektin-Fc-Chimären gemischt, zu den Zellen gegeben und die Proben erneut der durchflusszytometrischen Analyse unterzogen. In Abb. 4-22 sind die PhyS-4-Effekte dargestellt.

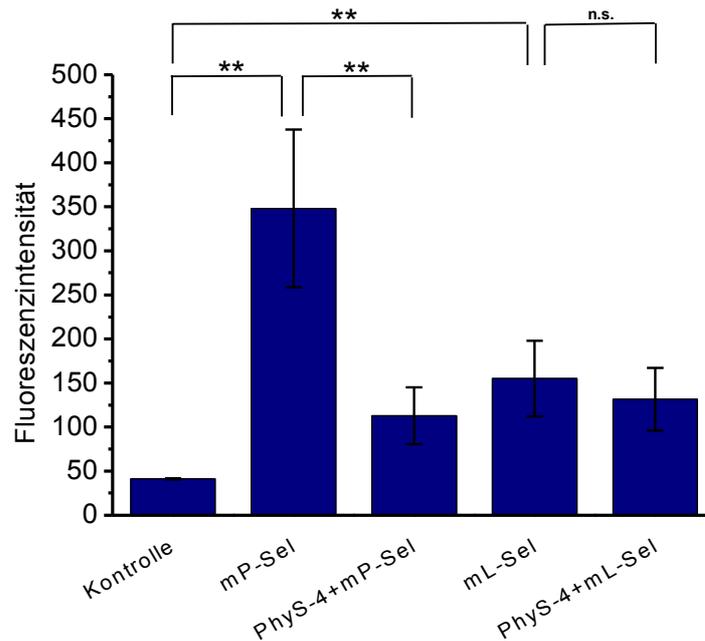


Abb. 4-22: Wechselwirkung von B16F10-Melanomzellen mit L- und P-Selektin sowie Einfluss von Phys-4. Die murinen Melanomzellen der Linie B16F10 wurden mit je 2,0 µg L- und P-Selektin-Fc-Chimären und zum Teil mit 10 µg Phys-4 und anschließend mit einem FITC-konjugierten anti-Human-IgG-Antikörper (Fc-spezifisch) inkubiert. Als Kontrolle dienten Proben, die nur B16F10 und den FITC-konjugierten Antikörper enthielten. mL-Sel, murines L-Selektin; mP-Sel, murines P-Selektin; n. s., nicht signifikant; Phys-4, Phycarinsulfat-4.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass in diesem Assay die P-Selektin-Inhibition durch Phys-4 bestätigt werden konnte. Im Gegensatz dazu kann die in Abb. 4-20 nachgewiesene drastische L-Selektin-Blockade im Fall der B16F10 nicht erreicht werden. Eine leichte Senkung der Werte ist festzustellen, die allerdings keinen statistisch signifikanten Unterschied ergibt. Über die Ursache dieses Resultates kann keine genaue Aussage getroffen werden. Möglicherweise sind die Liganden der B16F10 zu stärkeren Bindungen fähig als der auf U937 exprimierte PSGL-1. Da keine Affinität der B16F10 zu E-Selektin besteht, kann eine mögliche Inhibition durch Phys-4 mit dieser Versuchsanordnung nicht ermittelt werden. Dank der zuvor angestellten Untersuchungen am E-CHO/sLe^XLac1-System (Abb. 4-19) ist eine Aussage dazu allerdings möglich.

Das Glucansulfat Phys-4 weist P- und L-Selektin-inhibierendes Potential auf, wie durch die Kombination mehrerer Methoden nachgewiesen werden konnte. Eine Blockade von E-Selektin ist dagegen nicht möglich. Für die B16F10/L-Selektin-Wechselwirkung konnte die zuvor ermittelte Inhibierungskapazität (Abb. 4-20) nicht reproduziert werden. Eine direkte L-Selektin-vermittelte Interaktion zwischen Tumorzellen und Leukozyten *in vivo* ist

wahrscheinlich nur von untergeordneter Bedeutung. Für Heparin ist neben der Inhibition von P- auch die Blockade L-Selektin-abhängiger Schritte der Metastasierung beschrieben. Hierbei wird nicht die Tumorzell-Leukozyt-Bindung, sondern die Leukozyt-Endothel-Interaktion beeinflusst. Bei letzterer sind L-Selektin und endotheliale L-Selektin-Liganden involviert. Geht man davon aus, dass neben PNAds (s. Kapitel 2.1.2.2) endothelialer PSGL-1 (s. Kapitel 2.1.2.3) beteiligt sein könnte, ist eine der Abb. 4-20 entsprechenden starke L-Selektin-Hemmung durch Heparin anzunehmen.

Es ist bekannt, dass der Zeitpunkt der Heparin-Gabe dessen Wirkmechanismus beeinflusst (s. Kapitel 2.7.4). Eine frühe Injektion (30 Minuten vor Tumorzellinokulation) resultiert in der Blockade P-Selektin-abhängiger Prozesse, während eine späte Injektion (einige Stunden nach Tumorzellinokulation) hauptsächlich L-Selektin-vermittelte Schritte inhibiert. In den Untersuchungen zur Senkung der experimentellen Lungenmetastasierung (Abb. 4-18) wurde PhyS-4 30 Minuten vor B16F10-Inokulation injiziert. Demzufolge kann postuliert werden, dass PhyS-4 die in Abb. 4-18 dargestellte Metastasierungssenkung hauptsächlich über die Hemmung von P-Selektin entfaltet. Der Einfluss einer späten PhyS-4-Administration wurde nicht untersucht. Eine *in vivo* ablaufende L-Selektin-Hemmung durch PhyS-4 konnte allerdings mithilfe eines Mausmodells zur Untersuchung des „homings“ von T-Lymphozyten in periphere Lymphknoten ermittelt werden – einem Prozess, bei dem L-Selektin maßgeblich beteiligt ist. In Wildtyp-Tieren hatte eine PhyS-4-Injektion eine Blockade zur Folge, wogegen in $L^{-/-}$ -Tieren durch PhyS-4 keine weitere Senkung des „homings“ erzielt werden konnte, was die Inhibition von L-Selektin beweist³⁴². Bei der Lymphozytenrekrutierung ist wie für den angenommenen Vorgang der Leukozytenbeteiligung bei der Metastasierung eine Wechselwirkung von L-Selektin mit dem Endothel ausschlaggebend. Da PhyS-4 derartige Interaktionen inhibiert, ist aufgrund der *in vitro* und *in vivo* nachgewiesenen L-Selektin-Inhibierungsfähigkeit ein Eingriff in L-Selektin-vermittelte Prozesse im Metastasierungs-geschehen anzunehmen, wobei P-Selektin zu einem früheren Zeitpunkt blockiert wird.

4.3.2.1 Hemmung der Interaktion von Thrombozyten mit B16F10-Melanomzellen durch Heparine und PhyS-4

Wie mehrfach erwähnt, ergibt sich die Beteiligung von P-Selektin in einem frühen Stadium nach Tumorzellinvasion aus der Vermittlung von Tumorzell-Thrombozyt-Interaktionen. Um zu untersuchen, ob PhyS-4 diese Interaktionen inhibiert, wurden Calcein-gelabelte Thrombozyten mit Hoechst 33342-markierten B16F10 inkubiert und der Einfluss von

PhyS-4 im Vergleich zu Heparin-Natrium 5000 ratiopharm® und Enoxaparin-Natrium (Clexane®) ermittelt. Die Analyse erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie, wie im Kapitel 3.12.1 beschrieben. In den folgenden Abbildungen sind exemplarisch die Ergebnisse von mindestens drei Versuchen dargestellt.

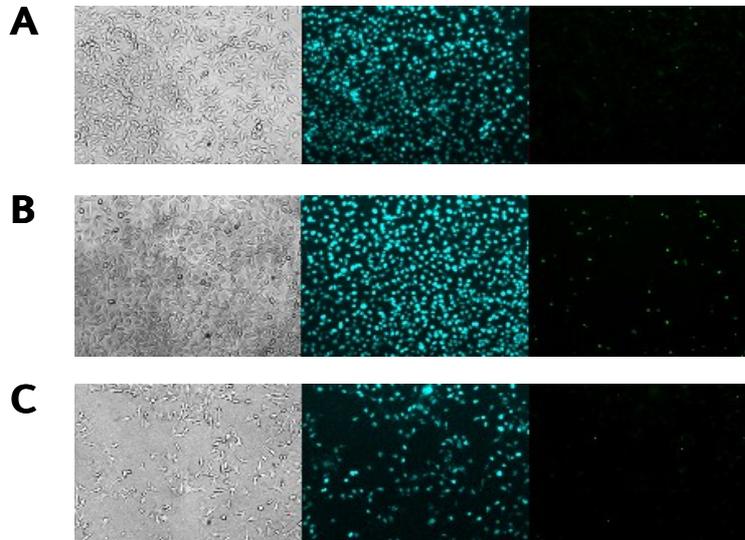


Abb. 4-23: Interaktion von ruhenden vs. aktivierten Thrombozyten mit B16F10-Melanomzellen. Isolierte Thrombozyten wurden Calcein-gelabelt, zum Teil mittels TRAP-14 aktiviert und mit Hoechst 33342-markierten adhärennten B16F10 inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei RT unter leichtem Schütteln wurde 2x gewaschen und jeweils identische Sichtbereiche mittels Phasenkontrast (*links*), DAPI- (*Mitte*) sowie FITC-Filter (*rechts*) betrachtet und ausgewertet. **A** B16F10+ruhende Thrombozyten. **B** B16F10+aktivierte Thrombozyten. **C** aktivierte Thrombozyten an nicht-konfluenten B16F10. (LD-Objektiv, 10fache Vergrößerung)

Gemäß Abb. 4-23 ist eine Adhäsion der Calcein-markierten Thrombozyten an die Melanomzellen zu erkennen, wie durch die grüne Fluoreszenz (FITC-Filter) gekennzeichnet ist. Dabei ist ein Unterschied zwischen ruhenden (Abb. 4-23A) und TRAP-14-aktivierten (Abb. 4-23B) Thrombozyten festzustellen. Mittels Durchflusszytometrie wurde bereits ein ähnliches Ergebnis erzielt (Abb. 4-10). Neben den Proben, die konfluente B16F10 enthielten, wurde die Adhäsion der Thrombozyten an nicht-konfluenten Zellen untersucht, um auszuschließen, dass unspezifische Wechselwirkungen mit dem Boden des Kulturgefäßes bestehen. In diesem Fall adhären deutlich weniger Thrombozyten, wobei nur im Bereich der B16F10 Interaktionen bestehen (Abb. 4-23C). Die potentiellen Bindungspaare wurden im Kapitel 4.1.5 diskutiert, wobei eine Beteiligung thrombozytären P-Selektins angenommen werden kann.

Für die folgenden Untersuchungen wurden die Testsubstanzen in je drei unterschiedlichen Mengen eingesetzt, wobei stets konfluente B16F10 verwendet wurden, um Vergleiche

che zu gewährleisten. Zunächst wurde das unfraktionierte Heparin-Natrium 5000 ratiopharm® getestet, wie in folgender Abbildung dargestellt (Abb. 4-24).

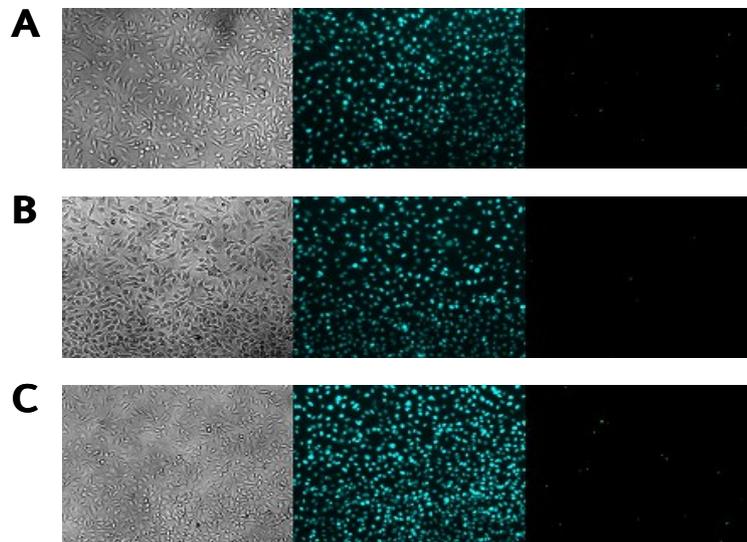


Abb. 4-24: Der Einfluss von Heparin-Natrium 5000 ratiopharm® auf die Wechselwirkung von aktivierten Thrombozyten mit B16F10-Melanomzellen. Die Vorbereitung und Analyse der Proben erfolgte wie beschrieben. Inhibierungsversuche wurden mit **A** 500 µg/ml **B** 250 µg/ml und **C** 50 µg/ml Heparin-Natrium 5000 ratiopharm® durchgeführt. (LD-Objektiv, 10fache Vergrößerung)

Der Einsatz des unfraktionierten Heparin-Natrium ratiopharm® resultierte in einer Senkung der Thrombozytenadhäsion gegenüber dem Kontrollexperiment (Abb. 4-23B). Dabei sind leichte Unterschiede zwischen den beiden höchsten und der niedrigen Konzentration zu beobachten. Um zu ermitteln, ob fraktioniertes Heparin einen ähnlichen Effekt verursacht, wurde nachfolgend der Einfluss von Enoxaparin-Natrium (Clexane®) untersucht. Wie das unfraktionierte Heparin ist das fraktionierte Heparin in der Lage, die Thrombozytenadhäsion zu inhibieren, wobei erneut leichte Unterschiede zwischen den getesteten Heparinkonzentrationen bestehen. Auch das Phycarinsulfat PhyS-4 erweist sich in diesem Assay als wirksam, wobei wiederum leichte Konzentrationsunterschiede bestehen. Um die Effekte aller Inhibitoren vergleichen zu können, werden sie im folgenden Diagramm zusammengefasst (Abb. 4-25).

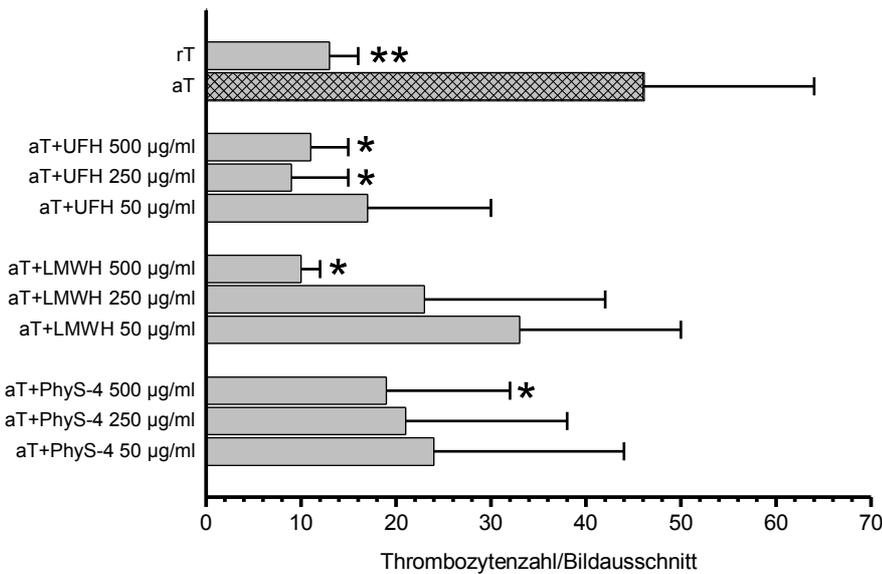


Abb. 4-25: Vergleichende Darstellung der Thrombozytenadhäsion an B16F10-Melanomzellen unter dem Einfluss verschiedener Testsubstanzen. Statistisch signifikante Unterschiede sind jeweils im Vergleich zu aktivierten Thrombozyten (*schraffiert*) angegeben.

aT, aktivierte Thrombozyten; LMWH, „low molecular weight heparin“ (Enoxaparin-Natrium, Clexane®); PhyS-4, Phycarinsulfat-4; rT, ruhende Thrombozyten; UFH, unfraktioniertes Heparin (Heparin-Natrium 5000 ratiopharm®).

Es ist ersichtlich, dass die TRAP-14-induzierte Thrombozytenaktivierung im Vergleich zu ruhenden Thrombozyten eine erhöhte Wechselwirkung mit den Melanomzellen nach sich zieht, was mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie vergleichbar ist (Fluoreszenzintensität B16F10+ruhende Thrombozyten vs. B16F10+aktivierte Thrombozyten: $250,63 \pm 51,15$ vs. $436,94 \pm 91,24$; $p < 0,05$). Alle untersuchten Substanzen sind in der jeweils größten Konzentration als wirksame Inhibitoren einzustufen. In den niedrigeren Konzentrationen sind schwächere Effekte zu verzeichnen, die zwar im Vergleich zum Kontrollversuch geringere Thrombozytenzahlen ergeben, die sich davon allerdings nicht mehr statistisch signifikant unterscheiden.

Es kann jedoch zusammengefasst werden, dass UFH, LMWH und PhyS-4 in der Lage sind, die Anlagerung von Thrombozyten an Melanomzellen konzentrationsabhängig zu inhibieren. Da anhand der bisherigen Untersuchungen eine P-Selektin-Hemmung der Substanzen nachgewiesen werden konnte, kann angenommen werden, dass PhyS-4 – wie Heparin – die Adhäsion der Thrombozyten an die Melanomzellen durch eine P-Selektin-Blockade herabsetzt. Da die Beteiligung von P-Selektin im Rahmen der Metastasierung v. a. in der Vermittlung von Tumorzell-Thrombozyt-Interaktionen liegt (s. Kapitel 2.5.4), kann durch den Einsatz von P-Selektin-Inhibitoren ein Eingriff in diesen Prozess erreicht werden. Der Mechanismus der Heparinwirkung ist teilweise nachgewiesen, wobei u. a. P-

und L-Selektin-hemmende Eigenschaften eine Metastasierungssenkung verursachen (s. Kapitel 2.7.4). Für das neuartige Glucansulfat Phys-4 konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eine P- und L-Selektin-Blockade sowie darüber hinaus eine Reduktion der Lungenmetastasierung³²⁷ gezeigt werden. Somit stellt diese Substanz einen vielversprechenden Arzneistoffkandidaten dar, die möglicherweise vergleichbar positive Effekte auf den Verlauf von Krebserkrankungen ausübt wie Heparin. Aufgrund der schwach antikoagulatorischen Aktivität³⁴⁴ könnte Phys-4 dem Heparin hinsichtlich Nutzen-Risiko-Verhältnis sogar überlegen sein.

4.4 Untersuchung Selektin-unabhängiger Adhäsionsmechanismen am Beispiel von B16F10-Melanomzellen

In den bisher vorgestellten Ergebnissen wurde auf die Beteiligung von Selektinen im Metastasierungs geschehen fokussiert und potentielle Inhibierungsmöglichkeiten vorgestellt. Neben Selektinen werden Integrine und Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie mit einer Metastasierung in Zusammenhang gebracht. Um weitere Bindungswege zu identifizieren, wurde nachfolgend die Melanomzelllinie B16F10 hinsichtlich Selektin-unabhängiger Metastasierungsmechanismen untersucht.

4.4.1 Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens von B16F10 an Endothelzellen unter physiologischen Flussbedingungen

Mit dem Ziel der weiteren Annäherung an physiologische Gegebenheiten wurde die Adhäsion von B16F10 am Endothel untersucht. Für diesen Zweck wurden murine Endothelzellen der Hirnrinde (bEnd3, s. Kapitel 3.7.2) auf Glasplättchen kultiviert, wie im Kapitel 3.11.2 erläutert. BEnd3-Endothelzellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche neben ICAM-1 und MadCAM-1 auch E- und P-Selektin sowie VCAM-1, deren Expression durch TNF- α , LPS oder IL-1 induziert oder erhöht werden kann^{345,346}. Aus diesem Grund wurden die bEnd3-Zellen vor der Durchführung der Adhäsionsexperimente mit 50 ng/ml TNF- α stimuliert. Die auf den Glasplättchen befindlichen stimulierten Zellen wurden in die Durchflussskammer eingebaut, um das Verhalten der B16F10 unter Flussbedingungen simulie-

ren zu können, wobei erneut die hydrostatische Methode Einsatz fand (s. Kapitel 3.11.4). Das Ergebnis ist in Abb. 4-26 dargestellt.

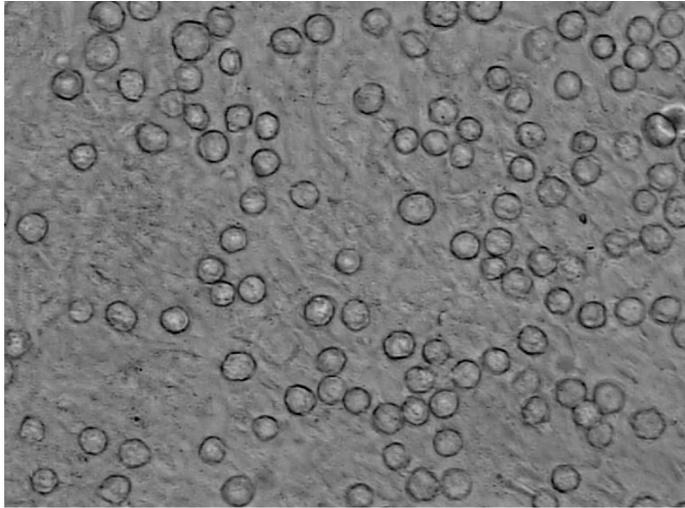


Abb. 4-26: Wechselwirkung von B16F10-Melanomzellen mit bEnd3-Endothelzellen unter Flussbedingungen. Murine Melanomzellen der Linie B16F10 wurden in die Durchflusskammer gespült, in die ein mit murinen bEnd3-Endothelzellen beschichtetes Glasplättchen eingebaut wurde. Nach einer fünfminütigen Sedimentationsphase wurden die B16F10 hinsichtlich ihres Adhäsionsverhaltens unter Flussbedingungen analysiert.
(LD-Objektiv, 20fache Vergrößerung)

Während mit einem P-Selektin-Substrat keine Wechselwirkungen der Zellen erfolgten, konnte an bEnd3-Endothelzellen eine Adhäsion beobachtet werden. Aufgrund der vorangegangenen Untersuchungen an isoliertem P-Selektin scheint endotheliales P-Selektin keine dominante Rolle einzunehmen. Möglicherweise herrschen jedoch andere Voraussetzungen, wenn der Rezeptor zellgebunden in physiologischer Umgebung vorliegt. Um eine Beteiligung von P-Selektin in diesem Versuchsaufbau auszuschließen, wurde das Verhalten der Zellen in Gegenwart eines P-Selektin-Antikörpers ermittelt (Abb. 4-27).

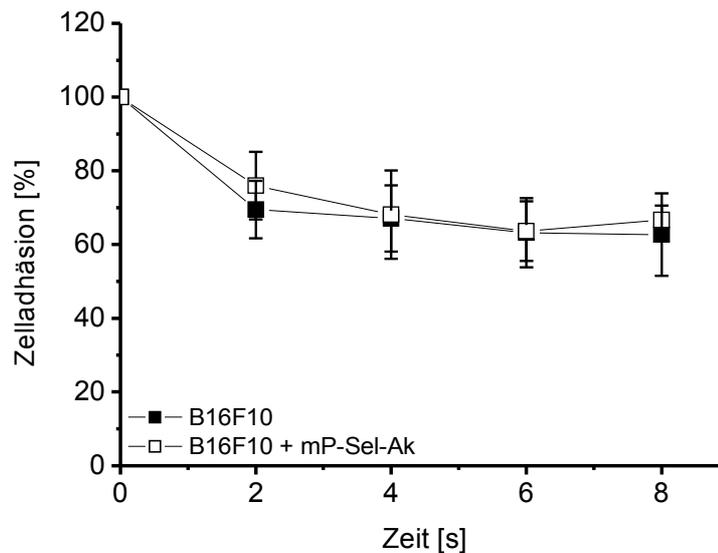


Abb. 4-27: Adhäsionsverhalten von B16F10 an bEnd3-Endothelzellen unter Flussbedingungen. Die murinen Melanomzellen der Linie B16F10 wurden in Anwesenheit eines mP-Selektin-Antikörpers hinsichtlich ihres Adhäsionsverhaltens unter Flussbedingungen über den angegebenen Zeitraum analysiert. B16F10, murine Melanomzellen; mP-Sel-Ak, anti-Maus-CD62P (P-Selektin).

Die Abbildung verdeutlicht, dass der P-Selektin-Antikörper unter diesen Bedingungen keine Senkung der Zelladhäsion verursacht, was erneut die fehlende P-Selektin-Beteiligung kennzeichnet. Demzufolge kann die aufgestellte Hypothese, wonach B16F10 nicht primär über die Wechselwirkung mit endotheliale P-Selektin metastasieren, bestätigt werden. Da durch die TNF- α -Behandlung der Endothelzellen die Expression weiterer Adhäsionsmoleküle gesteigert wird, ist der Einfluss anderer Bindungspaare anzunehmen.

Für Melanomzellen ist besonders die VLA-4/VCAM-1-Interaktion mit einer Metastasierung verbunden (s. Kapitel 2.5.6). Deren Beteiligung im Adhäsionsgeschehen wird in den nachfolgenden Untersuchungen näher charakterisiert. An den eingesetzten bEnd3-Zellen konnte in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen der Dissertation von Frau Sara Gosk eine TNF- α -induzierte VCAM-1-Expression nachgewiesen werden³⁴⁷. Die VLA-4-Positivität der verwendeten B16F10 wurde mittels Durchflusszytometrie (s. Kapitel 3.13.7) ermittelt, wie in Abb. 4-28 dargestellt.

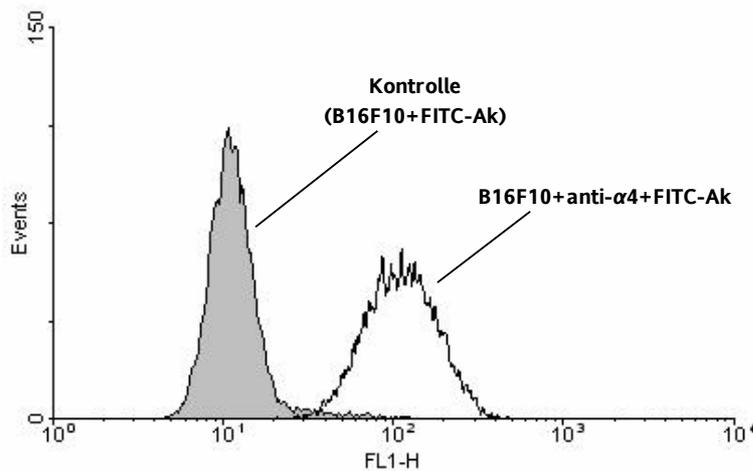


Abb. 4-28: VLA-4-Expression auf B16F10-Melanomzellen. Die murinen Melanomzellen der Linie B16F10 wurden mit einem gegen die $\alpha 4$ -Untereinheit des Integrins gerichteten Antikörper inkubiert und mit einem sekundären FITC-konjugierten Antikörper markiert. anti- $\alpha 4$, anti-Maus CD49d (Integrin $\alpha 4$ -Kette); B16F10, murine Melanomzellen; FITC-Ak, FITC-konjugierter anti-Ratte-IgG_{2a}-Antikörper; FL1-H, Fluoreszenzintensität in Kanal 1.

Dieser Versuch bestätigt zunächst das Vorliegen einer $\alpha 4$ -Untereinheit, die in VLA-4 mit einer $\beta 1$ -Kette assoziiert vorliegt. Die Expression von $\alpha 4\beta 7$, einem weiteren Integrin mit entsprechender α -Untereinheit kann nicht ausgeschlossen werden. Allerdings finden sich in der Literatur keine Hinweise auf eine derartige Expression bei Melanomzellen. Im Gegensatz dazu existieren zahlreiche Studien über das Vorliegen von VLA-4 und dessen Einfluss auf die Metastasierung.

Wie im Kapitel 2.2.2 vorgestellt, unterliegen Integrine einer schnellen Aktivierung, die sowohl über Aviditäts- als auch Affinitätsänderungen erreicht wird. Um diesem Phänomen Rechnung zu tragen, wurden die B16F10-Zellen in Anlehnung an Zwartz et al.¹²³ mit 1 mM Mn^{2+} stimuliert. Dadurch wird eine Konformationsänderung des Integrins mit einhergehender Affinitätserhöhung erzielt (s. Kapitel 2.2.2.1), wobei angenommen wird, dass Mn^{2+} im Bereich des MIDAS-Motivs der I-ähnlichen Domäne der β -Untereinheit bindet¹¹⁰.

In der folgenden Abbildung ist der Adhäsionsverlauf stimulierter vs. unstimulierter B16F10 an bEnd3-Zellen dargestellt, wobei zusätzlich die Involvierung von VCAM-1 berücksichtigt wird (Abb. 4-29).

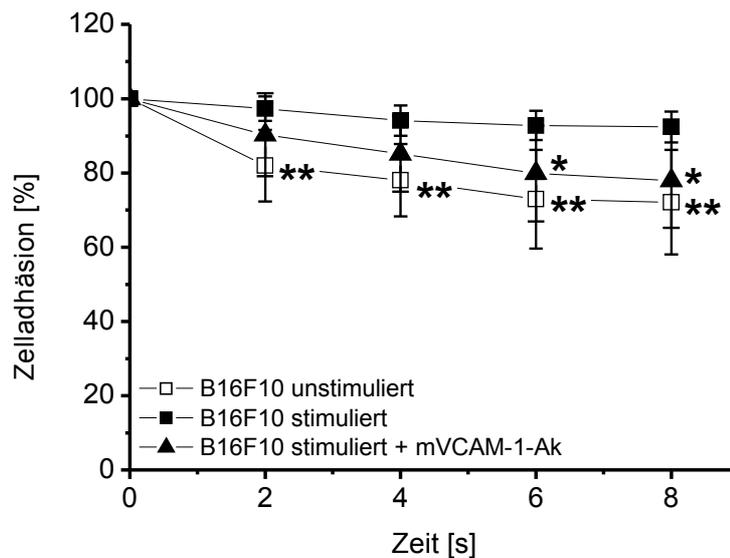


Abb. 4-29: Adhäsionsverhalten von B16F10-Melanomzellen an bEnd3-Endothelzellen unter Flussbedingungen. Die murinen Melanomzellen der Linie B16F10 wurden zum Teil mit 1 mM Mn^{2+} (5 min, 37°C) stimuliert und in Anwesenheit eines mVCAM-1-Antikörpers hinsichtlich ihres Adhäsionsverhaltens unter Flussbedingungen über den angegebenen Zeitraum analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede sind jeweils im Vergleich zur Adhäsion stimulierter B16F10 angegeben. B16F10, murine Melanomzellen; mVCAM-1-Ak, anti-Maus-CD106 (VCAM-1).

In Abb. 4-29 wird zum einen deutlich, dass die Mn^{2+} -Behandlung eine geringe, wenn auch statistisch signifikante Steigerung der Zelladhäsion zur Folge hat. Es fällt allerdings auf, dass bereits unbehandelte B16F10 ein hinreichendes Adhäsionsvermögen aufweisen. Desweiteren kann der Abb. 4-29 entnommen werden, dass eine VCAM-1-Blockade in einer Senkung der Werte resultiert, womit von einer VCAM-1-Beteiligung ausgegangen werden kann. Dessen Inhibition führt zwar zu einer statistisch signifikanten, allerdings unvollständigen Hemmung der Adhäsion. Dieses Phänomen der partiellen Inhibition durch VCAM-1-Antikörper konnte auch bei anderen Zell-Zell-Interaktionen *in vitro*³⁴⁸ und in einem Mausmodell der Melanomzellmetastasierung beobachtet werden, bei dem derselbe Antikörper (M/K-2) zum Einsatz kam²⁴⁴. Dies kann mit der Tatsache begründet werden, dass VCAM-1 meist in der 7d-Form mit zwei Integrinbindungsstellen vorliegt und somit eine bivalente VLA-4-Bindung vermittelt (s. Kapitel 2.3.1), die nicht komplett durch den Antikörper inhibiert wird. Von Abe und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass unter Flussbedingungen ausschließlich Modul 1 für die Interaktion mit $\alpha 4$ -Integrinen genutzt wird, während unter statischen Bedingungen sowohl Modul 1 als auch Modul 4 zur Ligandbindung beiträgt¹⁵² (s. Kapitel 2.3.1). Die in Abb. 4-29 vorgestellten Versuche wurden unter Flussbedingungen durchgeführt, weshalb angenommen werden könnte, dass

nur ein Ig-Modul beteiligt und somit der Einfluss der Bivalenz nicht gegeben sei. Allerdings könnten in der initialen fünfminütigen Sedimentationsphase durchaus Wechselwirkungen durch beide Module vermittelt werden.

Eine Überlappung mit anderen Bindungsmechanismen könnte ebenfalls die nur zum Teil eintretende Adhäsionssenkung durch VCAM-1-Blockade erklären. Anhand der zuvor angestellten Untersuchungen kann eine E- sowie P-Selektin-Beteiligung allerdings ausgeschlossen werden (Abb. 4-21 bzw. Abb. 4-27). Das ebenfalls auf bEnd3 exprimierte MadCAM-1 zählt zur Gruppe der PNAds und vermittelt Interaktionen mit L-Selektin und dem Integrin $\alpha 4\beta 7$ (s. Kapitel 2.1.2.2). Da B16F10 über keine der genannten Rezeptoren verfügt, scheint eine Adhäsion an MadCAM-1 unwahrscheinlich. Desweiteren erreicht dessen TNF- α -induzierte Expressionszunahme auf bEnd3-Zellen erst nach 12 bis 18 Stunden ihr Maximum³⁴⁶. Da die durchgeführten Untersuchungen nach vier Stunden erfolgten, kann nicht von einer deutlich ausgeprägten MadCAM-1-Expression ausgegangen werden. Allerdings wird im gleichen Zeitraum die ICAM-1-Expression gesteigert. Seine Liganden sind $\beta 2$ -Integrine, die typischerweise auf Leukozyten vorkommen. In malignen Melanomzellen sind dagegen aus der Reihe der β -Integrine erhöhte Level an $\beta 1$ - und $\beta 3$ -Untereinheiten zu finden. Von den bekannten, auf bEnd3 exprimierten Adhäsionsmolekülen scheint hinsichtlich der Ligandausstattung der B16F10 außer dem VCAM-1-vermittelten Bindungsweg kein anderer Mechanismus deren Adhäsion zu fördern. Unspezifische Wechselwirkungen könnten eine Rolle spielen, die die Untersuchungen ungünstig beeinflussen. Aus diesem Grund erfolgten alle weiteren Versuche an isoliertem VCAM-1, wie im folgenden vorgestellt wird.

4.4.2 Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens von B16F10 an VCAM-1 unter physiologischen Flussbedingungen

In Analogie zu den Versuchen an immobilisiertem P-Selektin erfolgte die kovalente Bindung von murinen VCAM-1-Fc-Chimären an der Oberfläche von Glasplättchen (s. Kapitel 3.11.1.2), die nachfolgend in die Durchflussskammer eingebaut wurden, um eine Untersuchung unter Flussbedingungen zu gewährleisten. Die B16F10-Zellen wurden in unbehandelter Form sowie Mn^{2+} -stimuliert mittels hydrostatischer Methode hinsichtlich ihres Adhäsionsverhaltens an VCAM-1 untersucht (Abb. 4-30).

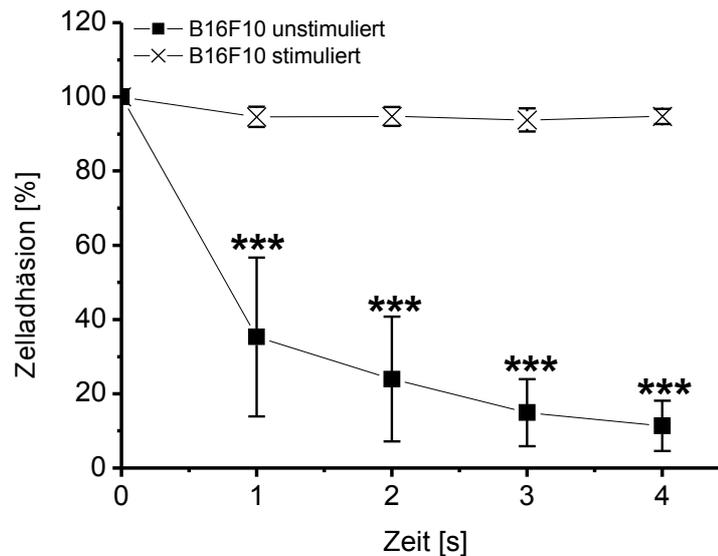


Abb. 4-30: Adhäsionsverhalten von B16F10-Melanomzellen an mVCAM-1 unter Flussbedingungen. Die murinen Melanomzellen der Linie B16F10 wurden zum Teil mit 1 mM Mn^{2+} (5 min, 37°C) stimuliert und nach einer fünfminütigen Sedimentationsphase hinsichtlich ihres Adhäsionsverhaltens unter Flussbedingungen über den angegebenen Zeitraum analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede sind jeweils im Vergleich zur Adhäsion stimulierter B16F10 angegeben. B16F10, murine Melanomzellen.

Es besteht eine starke Bindungsfähigkeit der B16F10 an VCAM-1, wobei die in Abb. 4-29 beobachtete Tendenz der Mn^{2+} -abhängigen Adhäsionsverstärkung an isoliertem VCAM-1 wesentlich deutlicher ausgeprägt ist. Der Einsatz des Rundlaufsystems lieferte dasselbe Ergebnis. Während unstimulierte B16F10 eine geringe Adhäsion zeigten, erhöhte sich diese drastisch nach Mn^{2+} -Injektion in das Fließmedium (Anzahl adhärerter Zellen unstimuliert vs. stimuliert: 4 ± 2 vs. 47 ± 9 ; $p < 0,01$). Damit unterscheidet sich dieses Ergebnis erheblich von dem in Abb. 4-29 gezeigten Resultat an Endothelzellen, bei dem unspezifische Wechselwirkungen möglicherweise einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss ausüben. Entgegen der Befunde von Saini et al.³⁴⁹ und Klemke et al.²⁴³, die ebenfalls die Melanomzelladhäsion an rekombinantem VCAM-1 untersuchten, erhöht eine Behandlung mit Mn^{2+} den Anteil adhärerter B16F10 erheblich. Es ist festzuhalten, dass in beiden Untersuchungen sowohl andere Zelllinien als auch andere Methoden verwendet wurden. Saini und Mitarbeiter nutzten einen statischen Adhäsionsassay, in dem die Zellen für einen Zeitraum von 60 Minuten mit VCAM-1 inkubiert wurden³⁴⁹, während von Klemke und Kollegen die Adhäsion der Zellen an VCAM-1 mittels Durchflusszytometrie nach 20-minütiger Inkubationszeit analysiert wurde²⁴³. In dem eingesetzten Flusskammerassay beträgt die Kontaktzeit zwischen Zellen und VCAM-1 allerdings nur fünf Minuten, bevor die Strömungsbedingungen einsetzen (hydrostatische Methode) bzw. befinden sich von Anfang

an unter Fließbedingungen (Rundlaufsystem). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass mit vergleichbaren Methoden ähnliche Ergebnisse erhalten werden. Es wäre denkbar, dass auf unbehandelten B1610 ein gewisser Anteil hochaffines VLA-4 vorhanden ist, der allerdings nicht ausreicht, um die Bindung zwischen den Zellen und VCAM-1 in der kurzen Zeit zu stabilisieren. Besteht dagegen die Möglichkeit einer längeren Wechselwirkung, könnte nach der initialen Ligandbindung durch hochaffines VLA-4 eine aktivitätserhöhende Clusterung der Integrinmoleküle auf der Zelloberfläche einsetzen, so dass eine Mn^{2+} -Behandlung möglicherweise keinen weiteren Effekt erzielt (s. Kapitel 2.2.2.2).

Es kann postuliert werden, dass zu einem frühen Zeitpunkt der metastatischen Kaskade hauptsächlich Selektin-vermittelte Prozesse zum tragen kommen und zu der Bildung von Mikroemboli führen, die in dem Arrest der Melanomzellen im Gefäßsystem resultieren. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit der direkten Adhäsion an das Endothel, die durch den VLA-4/VCAM-1-Bindungsweg vermittelt wird, womit dieser maßgeblich zur Metastasierung beiträgt. Eine Inhibition dieser Interaktion stellt demzufolge eine potentielle Intervention in die metastatische Kaskade VLA-4-positiver Tumorzellen dar. Wie im Kapitel 2.5.6.1 vorgestellt, sind einige Ansatzpunkte denkbar, die entweder endotheliales VCAM-1 oder Tumorzell-ständiges VLA-4 targetieren. Der Einsatz spezifischer VLA-4-Antagonisten birgt jedoch das Risiko unerwünschter Nebeneffekte, wie beispielsweise der Unterdrückung erforderlicher Immunantworten. In den vorangegangenen Kapiteln konnte demonstriert werden, dass Heparin und semisynthetische sulfatierte Polysaccharide in der Lage sind, über eine Selektinblockade in das Metastasierungs-geschehen einzugreifen. Während *in vivo* deutliche Effekte zu beobachten sind, stellt sich Heparin jedoch als relativ schwacher P-Selektin-Inhibitor *in vitro* heraus. Neben der Targetierung Selektin-vermittelter Vorgänge wird eine Reihe anderer Heparinwirkungen diskutiert, die potentiell bei der Metastasierungssenkung beteiligt sind. Dazu zählen beispielsweise (i) Inhibition der Angiogenese via TFPI-Freisetzung, (ii) Modulierung der Bindung von Wachstumsfaktoren und (iii) Hemmung der Heparanase-Aktivität (s. Kapitel 2.7.5). Neben diesen bekannten könnte Heparin über bislang unbekannte Mechanismen einen Eingriff in die metastatische Kaskade erreichen.

4.4.3 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges durch Heparin

Bislang konnte gezeigt werden, dass Melanomzellen neben Selektin-vermittelten Prozessen zusätzlich die VLA-4/VCAM-1-Interaktion nutzen. Im folgenden sollte untersucht werden, inwieweit ein Eingriff von Heparin in diesen Bindungsweg möglich ist. Dabei ist entweder die Targetierung von VLA-4 oder VCAM-1 denkbar. Um die Zielstruktur zu identifizieren, kam die Kombination unterschiedlicher Techniken zum Einsatz. Zunächst wurde das unfraktionierte Heparin-Natrium 5000 ratiopharm® hinsichtlich der Inhibition der B16F10-Adhäsion an VCAM-1-Fc-Chimären untersucht, wie in Abb. 4-31 dargestellt. Um einen maximalen Adhäsionseffekt zu erreichen, wurden die Zellen in allen Untersuchungen mit Mn^{2+} stimuliert.

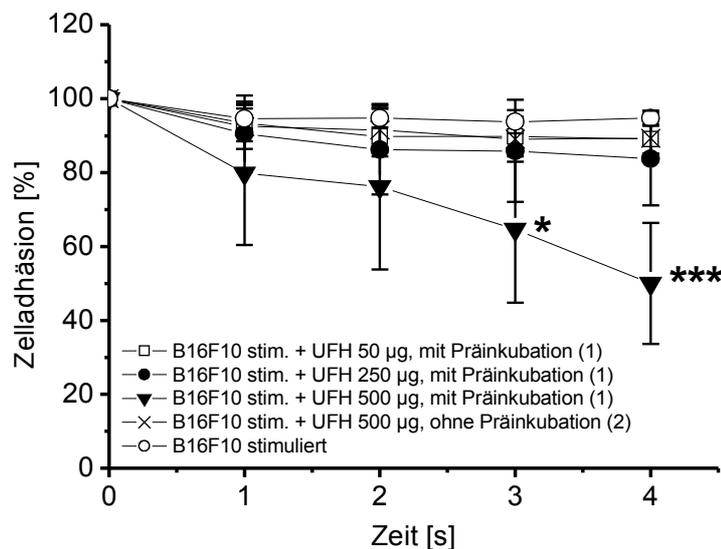


Abb. 4-31: Adhäsionsverhalten von B16F10-Melanomzellen an mVCAM-1 unter Flussbedingungen sowie Inhibition durch UFH. Die murinen Melanomzellen der Linie B16F10 wurden mit 1 mM Mn^{2+} (5 min, 37°C) stimuliert und nach einer fünfminütigen Sedimentationsphase hinsichtlich ihres Adhäsionsverhaltens unter Flussbedingungen über den angegebenen Zeitraum analysiert. Die Testung von UFH wurde mit (1) bzw. ohne (2) fünfminütige Präinkubation bei 37°C durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind jeweils im Vergleich zur Adhäsion stimulierter B16F10 angegeben. B16F10, murine Melanomzellen; stim., stimuliert; UFH, unfraktioniertes Heparin (Heparin-Natrium 5000 ratiopharm®).

Anhand der Abb. 4-31 wird deutlich, dass die Art des Versuchsaufbaus einen erheblichen Einfluss auf das Ergebnis nimmt. Während mit Methode 2, die hauptsächlich auf eine Hemmung des immobilisierten VCAM-1 abzielt, keine Inhibition beobachtet werden kann, wird durch die Modifizierung der Versuchsanordnung ein deutlicher Effekt erreicht, der konzentrationsabhängig erfolgt. Bei dieser als Methode 1 bezeichneten Durchführung werden die B16F10 zunächst mit Mn^{2+} und Heparin zusammen für fünf Minuten inkubiert. In diesem Zeitraum erfolgt die Wechselwirkung mit den Zellen, bevor diese in die Flusskammer gespült und analysiert werden. Dasselbe Ergebnis wird erhalten, wenn zuerst die Mn^{2+} -Stimulation der Zellen und anschließend die Präinkubation mit Heparin erfolgt.

Die Resultate deuten darauf hin, dass Heparin in die VLA-4/VCAM-1-Interaktion eingreift, indem es Strukturen auf Tumorzellseite inhibiert. Da der Bindungspartner von VCAM-1 auf den untersuchten B16F10 als das Integrin VLA-4 identifiziert werden konnte, kann eine Hemmung dieses Adhäsionsmoleküls angenommen werden. Eine Targetierung von VCAM-1 scheint dagegen nicht einzutreten.

Um die Hypothese zu überprüfen, wurden VCAM-1-Fc-Chimären auf einem Quarzkristall immobilisiert und eine potentielle Heparinbindung mittels QCM-Technik detektiert. Dieser Versuch wurde freundlicherweise von Herrn Dirk Simonis durchgeführt, dessen Ergebnis hier vorgestellt werden kann. Mithilfe dieser Technik konnte keine Bindung von Heparin-Natrium 5000 ratiopharm® an VCAM-1 ermittelt werden, was mit dem Resultat des Flusskammerassays übereinstimmt. Demzufolge scheint Heparin mit Oberflächenstrukturen der B16F10 in Wechselwirkung zu treten. Daher wurde im nächsten Schritt die Bindungsfähigkeit eines FITC-gelabelten unfraktionierten Heparins an die Zellen sowohl mittels Durchflusszytometrie (s. Kapitel 3.13.8) als auch mittels Fluoreszenzmikroskopie (s. Kapitel 3.12.2) untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-32 dargestellt.

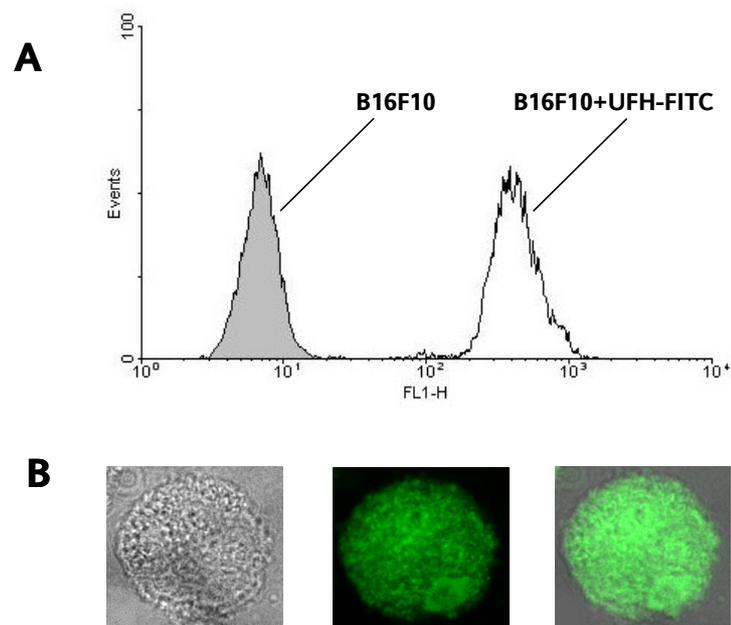


Abb. 4-32: Bindungsfähigkeit von unfraktioniertem Heparin an B16F10-Melanomzellen. **A** Die murinen Melanomzellen der Linie B16F10 wurden für den Zeitraum von fünf Minuten mit einem FITC-gelabelten unfraktionierten Heparin bei 37°C inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. **B** Die Auswertung erfolgte zusätzlich mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Die Bilder sind wie folgt dargestellt: *links* Phasenkontrast; *Mitte* FITC-Filter; *rechts* Overlay. (Ölimmersionsobjektiv, 63fache Vergrößerung)
B16F10, murine Melanomzellen; FL1-H, Fluoreszenzintensität in Kanal 1; UFH-FITC, FITC-gelabeltes unfraktioniertes Heparin.

Mithilfe beider Methoden kann eine deutlich ausgeprägte Bindung von Heparin an B16F10 nachgewiesen werden. Die eingangs aufgestellte Hypothese, wonach Heparin eher Strukturen auf Tumorzellseite als VCAM-1 inhibiert, kann somit bestätigt werden.

Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen wurde nachfolgend das fraktionierte Heparinderivat Enoxaparin-Natrium (Clexane®) im Hinblick auf eine Adhäsionsblockade von B16F10 an VCAM-1 untersucht, bei dem die zuvor als wirksam identifizierte Methode 1 eingesetzt wurde (Abb. 4-33).

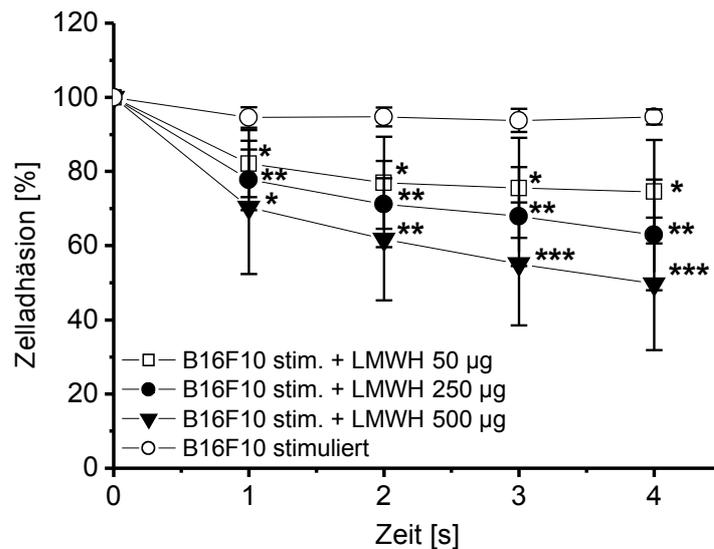


Abb. 4-33: Adhäsionsverhalten von B16F10-Melanomzellen an mVCAM-1 unter Flussbedingungen sowie Inhibition durch LMWH. Die murinen Melanomzellen der Linie B16F10 wurden mit 1 mM Mn^{2+} (5 min, 37°C) stimuliert und nach einer fünfminütigen Sedimentationsphase hinsichtlich ihres Adhäsionsverhaltens unter Flussbedingungen über den angegebenen Zeitraum analysiert. Die Untersuchung des LMWH-Einflusses erfolgte nach Präinkubation (Methode 1).

Statistisch signifikante Unterschiede sind jeweils im Vergleich zur Adhäsion stimulierter B16F10 angegeben.

B16F10, murine Melanomzellen; LMWH, „low molecular weight heparin“ (Enoxaparin-Natrium, Clexane®); stim., stimuliert.

Auch das fraktionierte Heparin ist in der Lage, nach Präinkubation mit den Zellen deren Adhäsion an VCAM-1 konzentrationsabhängig zu senken. Es fällt auf, dass in diesem Fall bereits bei geringeren Heparinmengen Effekte zu verzeichnen sind, wobei das Ausmaß der Adhäsionssenkung bei der größten eingesetzten Menge im Bereich der Werte für das unfraktionierte Heparin liegt. Aufgrund der Strukturähnlichkeiten zwischen UFH und LMWH kann für letzteres ein ähnlicher Wirkmechanismus angenommen werden, der in der Beeinflussung Tumorzell-ständiger Oberflächenmerkmale, wahrscheinlich VLA-4, liegt.

In der Literatur sind einige Studien zu Heparin-Integrin-Interaktionen beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass Heparin mit thrombozytärem GPIIb/IIIa interagiert und durch „outside-in signaling“ dessen Aktivitätsstadium und somit Fibrinogenbindung erhöht, was zum Teil die Heparin-induzierte Thrombozytenaggregation erklären kann³⁵⁰. Desweiteren ist eine Modulierung der Integrin-vermittelten Adhäsion leukämischer Zellen beschrieben. Dabei erhöht oder erniedrigt Heparin in Abhängigkeit der β -Untereinheit der untersuchten Integrine die Adhäsion an das Substrat Vitronektin. Während die Adhäsion von Zellen mit β 3-Integrinen verstärkt wird, ist bei β 5-exprimierenden Varianten eine Senkung zu ver-

zeichnen. Diese Effekte traten auf, wenn die Zellen mit Heparin inkubiert wurden, während eine Präinkubation von Vitronektin nur einen minimalen Einfluss hatte³⁵¹. Das leukozytäre Integrin Mac-1 (CD11b/CD18; α M β 2) wird ebenfalls mit einer Heparin- sowie Heparansulfat-Bindungs-fähigkeit in Zusammenhang gebracht. Dabei wird angenommen, dass über diesen Weg die feste Adhäsion von Neutrophilen am Endothel (nach initialem Selektin-vermittelten Kontakt) sowie deren Migration durch die EZM erfolgen³⁵². Letztendlich weist das ebenfalls von Leukozyten exprimierte Integrin α X β 2 (CD11c/CD18; gp150,95) eine Heparinbindungs-fähigkeit auf³⁵³. In zwei Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Wechselwirkung von der I-Domäne des entsprechenden Integrins vermittelt wird^{352,353}.

Für VLA-4 sind bisher keine Hinweise einer Heparinbindung dokumentiert. Aussagen zur Bindungsstelle können im Rahmen dieser Arbeit nicht getroffen werden. Da die α 4-Untereinheit von VLA-4 keine I-Domäne besitzt, könnte die Bindung über die I-ähnliche Domäne der β -Untereinheit erfolgen.

Es soll erwähnt werden, dass die Untersuchungen zwar belegen, dass Heparin an die Oberfläche der Melanomzellen bindet, ein eindeutiger Nachweis der VLA-4-Bindung allerdings nicht erbracht werden kann. Es wäre auch eine Wechselwirkung mit benachbarten Molekülen denkbar, was aufgrund der Molekülgröße von Heparin in der Hemmung von VLA-4 resultieren könnte. Die Möglichkeit des direkten Nachweises eines Bindungsereignisses wäre eine der für VCAM-1 durchgeführten analogen Untersuchung an immobilisierten VLA-4 mittels QCM-Technik, die aufgrund der fehlenden kommerziellen Verfügbarkeit von rekombinantem VLA-4 bislang nicht durchgeführt werden konnte. Möglicherweise kann eine Membranpräparation der B16F10 weitere Aufschlüsse geben.

Wenn auch das Heparintarget bisher nicht eindeutig spezifiziert werden kann, ist doch eine Inhibition der Melanomzelladhäsion an VCAM-1 mittels Heparin ersichtlich, was dessen Wirkspektrum erweitert. Abschließend wurde das Phycarinsulfat Phys-4 untersucht, von dem angenommen werden kann, dass es aufgrund seines ebenfalls polyanionischen Charakters an Strukturen auf Tumorzellseite bindet und die VCAM-1-vermittelte Zelladhäsion inhibiert. Die folgende Abbildung stellt das Ergebnis dar (Abb. 4-34).

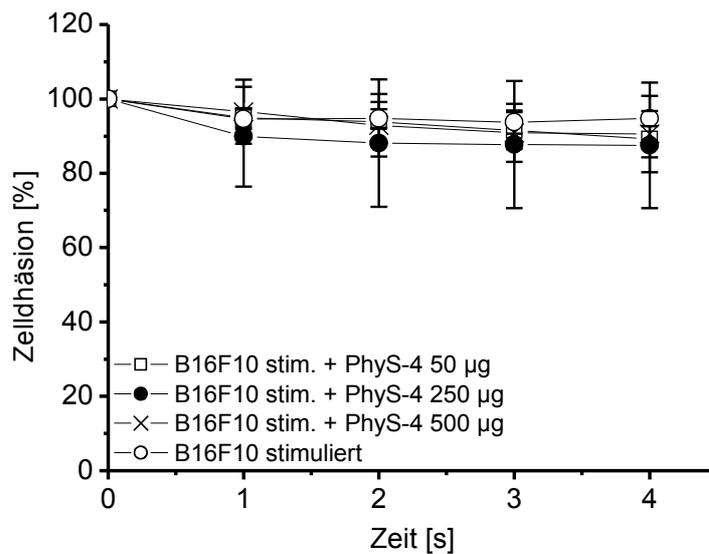


Abb. 4-34: Adhäsionsverhalten von B16F10-Melanomzellen an mVCAM-1 unter Flussbedingungen sowie Inhibition durch PhyS-4. Die murinen Melanomzellen der Linie B16F10 wurden mit 1 mM Mn^{2+} (5 min, 37°C) stimuliert und nach einer fünfminütigen Sedimentationsphase hinsichtlich ihres Adhäsionsverhaltens unter Flussbedingungen über den angegebenen Zeitraum analysiert. Die Untersuchung des PhyS-4-Einflusses erfolgte nach Präinkubation (Methode 1). B16F10, murine Melanomzellen; PhyS-4, Phycarinsulfat-4; stim., stimuliert.

Interessanterweise stellt sich heraus, dass PhyS-4 nicht in der Lage ist, einen den getesteten Heparinen vergleichbaren Effekt zu erzielen. Die Adhäsion der Zellen bleibt unbeeinflusst; eine Hemmung der VLA-4/VCAM-1-Interaktion ist nicht zu verzeichnen. Somit scheinen die beobachteten Ergebnisse spezifisch für Heparin zu sein. In ähnlicher Weise binden Chondroitin- und Keratansulfat sowie Hyaluronsäure nicht an das Integrin Mac-1³⁵². Daher kann angenommen werden, dass Heparin-Integrin-Wechselwirkungen keine unspezifischen Bindungen an Sulfatgruppen oder andere negativ geladene Strukturen widerspiegeln. Welche konkreten Strukturelemente von Heparin an einer VLA-4-Bindung beteiligt sind, bleibt zu klären. Anhand chemisch modifizierter Heparine konnte für die Mac-1/Heparin-Bindung entweder eine O- oder N-Sulfatierung als essentiell identifiziert werden, wobei zusätzliche Bindungsmotive eine Rolle spielen³⁵².

Die Inhibierungsversuche demonstrieren die Überlegenheit von Heparin gegenüber dem Phycarinsulfat. Während PhyS-4 nur die Selektin-vermittelte Zelladhäsion inhibiert, beeinflussen UFH und LMWH darüber hinaus den VLA-4/VCAM-1-Bindungsweg. Damit scheint sich die eingangs aufgestellte Vermutung, wonach PhyS-4 aufgrund seiner stärkeren P-Selektin-Hemmung und schwachen Antikoagulation hinsichtlich Nutzen-Risiko-Verhältnis für einen klinischen Einsatz bei onkologischen Patienten besser geeignet sein

könnte, nicht zu bestätigen. Bei Tumoren, die hauptsächlich Selektin-vermittelt metastasieren, wäre die Anwendung von PhyS-4 sicherlich effektiv. Handelt es sich aber um Metastasierungsprozesse, die zusätzlich die VLA-4/VCAM-1-Interaktion nutzen, erweist sich Heparin als weitaus effektiver und erscheint als multifunktionales Biopolymer.

Damit unterstützen die gewonnenen experimentellen Daten die klinischen Befunde von Heparin als vielversprechende antimetastatisch wirksame Substanz. Darüber hinaus wird zum ersten Mal gezeigt, dass Heparin in den VLA-4/VCAM-1-Bindungsweg eingreift, womit ein neues Target vorgeschlagen wird. Die Ergebnisse könnten daher zu dem Verständnis beitragen, wie Heparin seine antimetastatische Aktivität entfaltet.

5 Zusammenfassung

Unterschiedliche Klassen von Adhäsionsmolekülen übernehmen aufgrund ihrer Wechselwirkung mit Tumorzellen wichtige Funktionen bei der hämatogenen Metastasierung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen *in vitro*-Methoden zum Einsatz, die Einblicke in die zugrunde liegenden Mechanismen erlauben. Dabei wurde aufgrund der Verwendung eines Durchflusssystems die Simulation physiologischer Bedingungen erreicht.

Zellen unterschiedlicher Tumorentitäten wurden hinsichtlich ihrer Ligandausstattung und Bindungsfähigkeit an P-Selektin untersucht. Die Ergebnisse favorisieren dabei die Beteiligung von thrombozytärem P-Selektin, welches die Anlagerung von Thrombozyten an Tumorzellen vermittelt und damit metastasierungsfördernde Effekte erzielt. Eine direkte Adhäsion an endotheliales P-Selektin war dagegen nicht nachzuweisen, wodurch gezeigt werden konnte, dass sich die Extravasationsmechanismen von Tumorzellen und Leukozyten erheblich voneinander unterscheiden. Am Beispiel der murinen Melanomzelllinie B16F10 konnte die Bedeutung der VLA-4/VCAM-1-Wechselwirkung als zusätzlicher Bindungsweg demonstriert werden.

Heparin nimmt aufgrund seiner Selektininhibition eine bedeutende Rolle bei dem Eingriff in die hämatogene Metastasierung von Tumorzellen ein. Aufgrund seiner komplexen strukturellen Zusammensetzung ist die Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen allerdings erschwert. Daher bietet sich der Einsatz semisynthetischer Glucansulfate mit definierter chemischer Zusammensetzung an. Es wurden unterschiedliche Heparinderivate und drei Reihen semisynthetischer Glucansulfate hinsichtlich ihrer P-Selektin-Blockade getestet. Dabei konnte der Fokus auf den Einfluss struktureller Parameter gelegt werden. Demnach spielt die Molekülgröße eine untergeordnete Rolle, wogegen Sulfatierungsgrad und Kohlenhydratgrundgerüst entscheidende Faktoren darstellen und die P-Selektin-Hemmung kontrollieren. Im Gegensatz zu Heparin mit vergleichsweise schwacher Inhibierungskapazität *in vitro*, erwiesen sich Glucansulfate mit optimalen strukturellen Voraussetzungen als effektive Hemmstoffe. Das Phycarinsulfat PhyS-4 konnte darüber hinaus als wirksamer L-Selektin-Blocker sowie als aktiv unter *in vivo*-Bedingungen identifiziert werden. Heparinderivate und PhyS-4 waren in der Lage, die Anlagerung von Thrombozyten an Melanomzellen zu unterdrücken, womit deren postulierter Wirkmechanismus der P-Selektin-Blockade im Rahmen der Metastasierung bestätigt werden konnte. Mit der Entwicklung von Heparin abgeleiteter Inhibitoren, die sich durch eine geringere Antikoagulation auszeichnen, ist dessen Ersatz bei bestimmten klinischen Anwendungen denkbar, wodurch sie potentielle Arzneistoffkandidaten darstellen.

Zusätzlich zu der moderat ausgerägten P-Selektin-Inhibition beeinflusst Heparin im Gegensatz zu PhyS-4 die VLA-4/VCAM-1-Interaktion. Demnach deckt Heparin ein breiteres Wirkspektrum ab, was von dem semisynthetischen Glucansulfat nicht erreicht werden kann. Durch die Kombination unterschiedlicher Methoden konnte gezeigt werden, dass das Heparintarget eher die Tumorzelle selbst als das endothelial exprimierte VCAM-1 ist. Eine Inhibition des Integrins VLA-4 kann vermutet werden. Damit wird ein weiterer Mechanismus der Heparin-vermittelten Metastasierungssenkung deutlich und demonstriert einmal mehr dessen Potential in der begleitenden Therapie onkologischer Erkrankungen.

6 Literaturverzeichnis

1. Chou KC. The convergence-divergence duality in lectin domains of selectin family and its implications. *FEBS Lett* **1995** 363: 123-6.
2. Revelle BM, Scott D, Beck PJ. Single amino acid residues in the E- and P-selectin epidermal growth factor domains can determine carbohydrate binding specificity. *J Biol Chem* **1996** 271: 16160-70.
3. Phan UT, Waldron TT, Springer TA. Remodeling of the lectin-EGF-like domain interface in P- and L-selectin increases adhesiveness and shear resistance under hydrodynamic force. *Nat Immunol* **2006** 7: 883-9.
4. Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* **1999** 79: 181-213.
5. Disdier M, Morrissey JH, Fugate RD, Bainton DF, McEver RP. Cytoplasmic Domain of P-Selectin (CD62) Contains the Signal for Sorting into Regulated Secretory Pathway. *Mol Biol Cell* **1992** 3: 309-21.
6. Kansas GS, Ley K, Munro JM, Tedder TF. Regulation of leukocyte rolling and adhesion to high endothelial venules through the cytoplasmic domain of L-selectin. *J Exp Med* **1993** 177: 833-8.
7. Yoshida M, Westlin WF, Wang N, Ingber DE, Rosenzweig A, Resnick N, Gimbrone MA, Jr. Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **1996** 133: 445-55.
8. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* **1993** 91: 379-87.
9. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Jr., Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* **1989** 243: 1160-5.
10. McEver RP. Regulation of expression of E-Selectin and P-Selectin. In: "The Selectins". *Harwood Academic Publishers* **1997**: 31-47.
11. Schindler U, Baichwal VR. Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol Cell Biol* **1994** 14: 5820-31.
12. Lee JI, Burckart GJ. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol* **1998** 38: 981-93.
13. Graves BJ, Crowther RL, Chandran C, Rumberger JM, Li S, Huang KS, Presky DH, Familletti PC, Wolitzky BA, Burns DK. Insight into E-selectin/ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of the lec/EGF domains. *Nature* **1994** 367: 532-8.
14. Huang KS, Graves BJ, Wolitzky BA. Functional analysis of Selectin structure. In: "The Selectins" *Harwood Academic Publishers* **1997**: 1-29.
15. Erlandsen SL, Hasslen SR, Nelson RD. Detection and spatial distribution of the beta 2 integrin (Mac-1) and L-selectin (LECAM-1) adherence receptors on human neutrophils by high-resolution field emission SEM. *J Histochem Cytochem* **1993** 41: 327-33.
16. Bruehl RE, Springer TA, Bainton DF. Quantitation of L-selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* **1996** 44: 835-44.
17. Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC. A cell surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* **1983** 304: 30-4.
18. Hafezi-Moghadam A, Ley K. Relevance of L-Selectin shedding for leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med* **1999** 189: 939-47.

19. Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* **1990** 343: 757-60.
20. McEver RP. Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycoconj J* **1997** 14: 585-91.
21. Setiadi H, Disdier M, Green SA, Canfield WM, McEver RP. Residues throughout the cytoplasmic domain affect the internalization efficiency of P-Selectin. *J Biol Chem* **1995** 270: 26818-26.
22. Foxall C, Watson SR, Dowbenko D, Fennie C, Lasky LA, Kiso M, Hasegawa A, Asa D, Brandley BK. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide. *J Cell Biol* **1992** 117: 895-902.
23. Cooke RM, Hale RS, Lister SG, Shah G, Weir MP. The conformation of the sialyl Lewis X ligand changes upon binding to E-selectin. *Biochemistry* **1994** 33: 10591-6.
24. Berg EL, Robinson MK, Mansson O, Butcher EC, Magnani JL. A carbohydrate domain common to both sialyl Le(a) and sialyl Le(X) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J Biol Chem* **1991** 266: 14869-72.
25. Handa K, Nudelman ED, Strout MR, Shiozawa T, Hakamori SI. Selectin GMP-140 (CD62, PADGEM) binds to sialyl Lewis^a and sialyl Lewis^x and sulfated glycans modulate this binding. *Biochim Biophys Res Comm* **1991** 181: 1223-30.
26. Jacob GS, Kirmaier C, Abbas SZ, Howard SC, Steininger CN, Welply JK, Scudder P. Binding of sialyl Lewis x to E-selectin as measured by fluorescence polarization. *Biochemistry* **1995** 34: 1210-7.
27. Weis WI, Drickamer K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu Rev Biochem* **1996** 61: 441-73.
28. Ushiyama S, Laue TM, Moore KL, Erickson HP, McEver RP. Structural and functional characterization of monomeric soluble P-selectin and comparison with membrane P-selectin. *J Biol Chem* **1993** 268: 15229-37.
29. Hensley P, McDevitt PJ, Brooks I, Trill JJ, Feild JA, McNulty DE, Connor JR, Griswold DE, Kumar NV, Kopple KD. The soluble form of E-selectin is an asymmetric monomer. Expression, purification, and characterization of the recombinant protein. *J Biol Chem* **1994** 269: 23949-58.
30. Yoshida M, Szente BE, Kiely JM, Rosenzweig A, Gimbrone MA, Jr. Phosphorylation of the cytoplasmic domain of E-selectin is regulated during leukocyte-endothelial adhesion. *J Immunol* **1998** 161: 933-41.
31. Kiely JM, Hu Y, Garcia-Cardena G, Gimbrone MA, Jr. Lipid raft localization of cell surface E-selectin is required for ligation-induced activation of phospholipase C gamma. *J Immunol* **2003** 171: 3216-24.
32. Toppila S, Lauronen J, Mattila P, Turunen JP, Penttilä L. L-selectin ligands in rat high endothelium: Multivalent sialyl Lewis x glycans are high-affinity inhibitors of lymphocyte adhesion. *Eur J Immunol* **1997** 27: 1360-5.
33. McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* **1997** 100: 97-103.
34. Vogel J, Bendas G, Bakowsky U, Hummel G, Schmidt RR, Kettmann U, Rothe U. The role of glycolipids in mediating cell adhesion: a flow chamber study. *Biochim Biophys Acta* **1998** 1372: 205-15.
35. Krauss K, Altevogt P. Integrin leukocyte function-associated antigen-1-mediated cell binding can be activated by clustering of membrane rafts. *J Biol Chem* **1999**: 36921-27.

36. Gege C, Vogel J, Bendas G, Rothe U, Schmidt RR. Synthesis of the sialyl Lewis X epitope attached to glycolipids with different core structures and their selectin-binding characteristics in a dynamic test system. *Chemistry* **2000** 6: 111-22.
37. Bakowsky U, Schumacher G, Gege C, Schmidt RR, Rothe U, Bendas G. Cooperation between lateral ligand mobility and accessibility for receptor recognition in selectin-induced cell rolling. *Biochemistry* **2002** 41: 4704-12.
38. Schumacher G, Bakowsky U, Gege C, Schmidt RR, Rothe U, Bendas G. Lessons learned from clustering of fluorinated glycolipids on selectin ligand function in cell rolling. *Biochemistry* **2006** 45: 2894-903.
39. Varki A. Selectin ligands: will the real ones please stand up? *J Clin Invest* **1997** 99: 158-62.
40. Levinovitz A, Muhlhoff J, Isenmann S, Vestweber D. Identification of a glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells. *J Cell Biol* **1993** 121: 449-59.
41. Burrus LW, Zuber ME, Lueddecke BA, Olwin BB. Identification of a cystein-rich receptor for fibroblast growth factor. *Mol Biol Cell* **1992** 12: 5600-09.
42. Steegmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, Borges E, Lenter M, Kocher HP, Kleuser B, Vestweber D. The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature* **1995** 373: 615-20.
43. Gonatas JO, Mourelatos Z, Stieber A, Lane WS, Brosius J, Gonatas NK. MG-160, a membrane sialoglycoprotein of the medial cisternae of the rat Golgi apparatus, binds basic fibroblast growth factor and exhibits a high level of sequence identity to a chicken fibroblast growth factor receptor. *J Cell Sci* **1995** 108: 457-67.
44. Zuber E, Zhou Z, Burrus LW, Olwin BB. Cystein-rich FGF receptor regulates intracellular FGF-1 and FGF-2 levels. *J Cell Physiol* **1997** 170: 217-27.
45. Ahn J, Febbraio M, Silverstein RL. A novel isoform of human Golgi complex-localized glycoprotein-1 (also known as E-selectin ligand-1, MG-160 and cysteine-rich fibroblast growth factor receptor) targets differential subcellular localization. *J Cell Sci* **2005** 118: 1725-31.
46. Gonatas JO, Chen Y-J, Stieber A, Mourelatos Z, Gonatas NK. Truncations of the C-terminal cytoplasmic domain of MG-160, a medial Golgi sialoglycoprotein, result in its partial transport to the plasma membrane and filopodia. *J Cell Sci* **1998** 111: 249-60.
47. Hensel F, Brändlein S, Eck M, Schmidt K, Krenn V, Kloetzer A, Bachi A, Mann M, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP. A novel proliferation-associated variant of CFR-1 defined by a human monoclonal antibody. *Lab Invest* **2001** 81: 1097-1107.
48. Dimitroff CJ, Descheny L, Trujillo N, Kim R, Nguyen V, Huang W, Pienta KJ, Kutok JL, Rubin MA. Identification of leukocyte E-selectin ligands, P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1, on human metastatic prostate tumor cells. *Cancer Res* **2005** 65: 5750-60.
49. Lenter M, Levinovitz A, Isenmann S, Vestweber D. Monospecific and common glycoprotein ligands for E- and P-selectin on myeloid cells. *J Cell Biol* **1994** 125: 471- 81.
50. Steegmaier M, Borges E, Berger J, Schwarz H, Vestweber D. The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface. *J Cell Sci* **1997** 110 (Pt 6): 687-94.
51. Gout S, Morin C, Houle F, Huot J. Death receptor-3, a new E-Selectin counter-receptor that confers migration and survival advantages to colon carcinoma cells by triggering p38 and ERK MAPK activation. *Cancer Res* **2006** 66: 9117-24.
52. Girard JP, Springer TA. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* **1995** 16: 449-57.
53. Gowans JL, Knight EJ. The route of recirculation of lymphocytes in the rat. *Proc R Soc London Ser B* **1964** 159: 257-82.

54. Brustein M, Kraal G, Mebius RE, Watson S. Identification of a soluble form of a ligand for the lymphocyte homing receptor. *J Exp Med* **1992** 176: 1415-19.
55. Mebius RE, Dowbenko D, Williams A, Fennie C, Lasky LA, Watson SR. Expression of GlyCAM-1, an endothelial ligand for L-Selectin, is affected by afferent lymphatic flow. *J Immunol* **1993** 151: 6769-76.
56. Hwang ST, Singer MS, Giblin PA, Yednock TA, Bacon KB, Simon SI, Rosen SD. GlyCAM-1, a physiologic ligand for L-selectin, activates beta 2 integrins on naive peripheral lymphocytes. *J Exp Med* **1996** 184: 1343-8.
57. Sanders WJ, Katsumoto TR, Bertozzi CR, Rosen SD, Kiessling LL. L-Selectin carbohydrate interactions: Relevant modifications of the Lewis X trisaccharide. *Biochemistry* **1996** 35: 14862-7.
58. Mitsuoka C, Sawada-Kasugai M, Ando-Furui K, Izawa M, Nakanishi H, Nakamura S, Ishida H, Kiso M, Kannagi R. Identification of a major carbohydrate capping group of the L-selectin ligand on high endothelial venules in human lymph nodes as 6-sulfo sialyl Lewis X. *J Biol Chem* **1998** 273: 11225-33.
59. van Zante A, Rosen SD. Sulphated endothelial ligands for L-selectin in lymphocyte homing and inflammation. *Biochem Soc Trans* **1993** 31: 313-7.
60. Puri KD, Finger EB, Gaudernack G, Springer TA. Sialomucin CD34 is the major L-selectin ligand in human tonsil high endothelial venules. *J Cell Biol* **1995** 131.
61. Sassetti C, Tangemann K, Singer MS, Kershaw DB, Rosen SD. Identification of podocalyxin as an HEV ligand for L-selectin: parallels to CD34. *J Exp Med* **1998** 187: 1965-75.
62. Streeter PR, Rouse BTN, Butcher EC. Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes. *J Cell Biol* **1988** 107: 1853-62.
63. Samulowitz U, Kuhn A, Brachtendorf G, Nawroth R, Braun A. Human endomucin: distribution pattern, expression on high endothelial venules, and decoration with the MECA-79 epitope. *Am J Pathol* **2002** 160: 1669-81.
64. Berg EL, McEvoy LM, Berlin C, Bargatze RF, Butcher EC. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MadCAM-1. *Nature* **1993** 366: 695-98.
65. Bargatze RF, Jutila MA, Butcher EC. Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multi-step model confirmed and refined. *Immunity* **1995** 3: 99-108.
66. Clark RA, Fuhlbrigge RC, Springer TA. L-Selectin ligands that are O-glycoprotease resistant and distinct from MECA-79 antigen are sufficient for tethering and rolling of lymphocytes on human high endothelial venules. *J Cell Biol* **1998** 140: 721-31.
67. Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* **1989** 56: 379-90.
68. Semenkovich CF, Ostlund RE, Jr., Olson MO, Yang JW. A protein partially expressed on the surface of HepG2 cells that binds lipoproteins specifically is nucleolin. *Biochemistry* **1990** 29: 9708-13.
69. Deng JS, Ballou B, Hofmeister JK. Internalization of anti-nucleolin antibody into viable HEp-2 cells. *Mol Biol Rep* **1996** 23: 191-5.
70. Harms G, Kraft R, Grelle G, Volz B, Dervedde J, Tauber R. Identification of nucleolin as a new L-selectin ligand. *Biochem J* **2001** 360: 531-58.
71. Oxley SM, Sackstein R. Detection of an L-selectin ligand on a hematopoietic progenitor cell line. *Blood* **1994** 84: 3299-306.
72. Dimitroff CJ, Lee JY, Fuhlbrigge RC, Sackstein R. A distinct glycoform of CD44 is an L-selectin ligand on human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000** 97: 13841-6.
73. Bargatze RF, Kurk S, Butcher EC, Jutila MA. Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J Exp Med* **1994** 180: 1785-92.

74. Fuhlbrigge RC, Alon R, Puri KD, Lowe JB, Springer TA. Sialylated, fucosylated ligands for L-selectin expressed on leukocytes mediate tethering and rolling adhesions in physiologic flow conditions. *J Cell Biol* **1996** 135: 837-48.
75. Rosen SD. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol* **2004** 22: 129-56.
76. Moore KL, Stults NL, Diaz S, Smith DF, Cummings RD, Varki A, McEver RP. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol* **1992** 118: 445-56.
77. Vachino G, Chang XJ, Veldman GM, Kumar R, Sako D, Fouser MC, Berndt MC, Cumming DA. P-selectin glycoprotein ligand-1 is the major counter-receptor for P-selectin on stimulated T cells and is widely distributed in non-functional form on many lymphocytic cells. *J Biol Chem* **1995** 270: 21966-74.
78. Norgard KE, Moore KL, Diaz S, Stults NL, Ushiyama S, McEver RP, Cummings RD, Varki A. Characterization of a specific ligand for P-selectin on myeloid cells. A minor glycoprotein with sialylated O-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* **1993** 268: 12764-74.
79. Wilkins PP, McEver RP, Cummings RD. Structures of the O-glycans on P-selectin glycoprotein ligand-1 from HL-60 cells. *J Biol Chem* **1996** 271: 18732-42.
80. Sako D, Comess KM, Barone KM, Camphausen RT, Cummings RD, Shaw DA. A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding. *Cell* **1995** 83: 323-31.
81. Pouyari T, Seed B. PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus. *Cell* **1995** 83: 333-43.
82. Walcheck B, Moore KL, McEver RP, Kishimoto TK. Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation of P-selectin in vitro. *J Clin Invest* **1996** 98: 1081-7.
83. Moore KL, Eaton SF, Lyons DE, Lichenstein HS, Cummings RD, McEver RP. The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, O-linked poly-N-acetyllactosamine. *J Biol Chem* **1994** 269: 23318-27.
84. Somers WS, Tang J, Shaw GD, Camphausen RT. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell* **2000** 103: 467-79.
85. Martinez M, Joffraud M, Giraud S, Baisse B, Bernimoulin MP, Schapira M, Spertini O. Regulation of PSGL-1 interactions with L-selectin, P-selectin, and E-selectin: role of human fucosyltransferase-IV and -VII. *J Biol Chem* **2005** 280: 5378-90.
86. Hirata T, Merrill-Skoloff G, Aab M, Yang J, Furie BC, Furie B. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is a physiological ligand for E-selectin in mediating T helper 1 lymphocyte migration. *J Exp Med* **2000** 192: 1669-76.
87. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* **2000** 191: 1413-22.
88. da Costa Martins P, Garcia-Vallejo JJ, van Thienen JV, Fernandez-Borja M, van Gils JM, Beckers C, Horrevoets AJ, Hordijk PL, Zwaginga JJ. P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2007** 27: 1023-9.
89. Hirata T, Furukawa Y, Yang BG, Hieshima K, Fukuda M, Kannagi R, Yoshie O, Miyasaka M. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) interacts with the skin-associated chemokine CCL27 via sulfated tyrosines at the PSGL-1 amino terminus. *J Biol Chem* **2004** 279: 51775-82.

90. Jackson D, Waibel R, Weber E, Bell J, Stahel RA. CD24, a signal transducing molecule expressed on human B cells, is a major surface antigen on small cell lung carcinomas. *Cancer Res* **1992** 52: 5264.
91. Akashi T, Shirasawa T, Hirokawa K. Gene expression of CD24 core polypeptide molecule in normal rat tissues and human tumor cell lines. *Virchows Arch* **1994** 425: 399.
92. Aigner S, Ruppert M, Hubbe M, Sammar M, Sthoeger Z, Butcher EC, Vestweber D, Altevogt P. Heat stable antigen (mouse CD24) supports myeloid cell binding to endothelial and platelet P-selectin. *Int Immunol* **1995** 7: 1557-65.
93. Aigner S, Sthoeger ZM, Fogel M, Weber E, Zarn J, Ruppert M, Zeller Y, Vestweber D, Stahel R, Sammar M, Altevogt P. CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood* **1997** 89: 3385-95.
94. Friederichs J, Zeller Y, Hafezi-Moghadam A, Grone HJ, Ley K, Altevogt P. The CD24/P-selectin binding pathway initiates lung arrest of human A125 adenocarcinoma cells. *Cancer Res* **2000** 60: 6714-22.
95. Lim SC, Oh SH. The role of CD24 in various human epithelial neoplasias. *Pathol Res Pract* **2005** 201: 479-86.
96. Su MC, Hsu C, Kao HL, Jeng YM. CD24 expression is a prognostic factor in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Lett* **2006** 235: 34-9.
97. Aruffo A, Kolanus W, Walz G, Fredman P, Seed B. CD62/P-selectin recognition of myeloid and tumor cell sulfatides. *Cell* **1991** 67: 35-44.
98. Garcia J, Callewaert N, Borsig L. P-selectin mediates metastatic progression through binding to sulfatides on tumor cells. *Glycobiology* **2007** 17: 185-96.
99. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet GPIb-V-IX complex. Structure, function, physiology, and pathology. *Semin Thromb Hemost* **1995** 21: 130-6.
100. Romo GM, Dong J-F, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, McIntire LV, Berndt MC, López JA. The Glycoprotein Ib-IX-V Complex Is a Platelet Counter-receptor for P-Selectin. *J Exp Med* **1999** 190: 803-13.
101. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* **1995** 57: 827-72.
102. Bendas G. Inhibitors of membrane receptors involved with leukocyte extravasation. *Mini Rev Med Chem* **2005** 5: 575-84.
103. Müller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* **1993** 178: 449-60.
104. Pfarrer C, Hirsch P, Guillomot M, Leiser R. Interaction of integrin receptors with extracellular matrix is involved in trophoblast giant cell migration in bovine placentomes. *Placenta* **2003** 24: 588-97.
105. Stewart M, Thiel M, Hagg N. Leukocyte integrins. *Curr Opin Cell Biol* **1995** 7: 690-96.
106. Dardik R, Savion N, Kaufmann Y, Varon D. Thrombin promotes platelet-mediated melanoma cell adhesion to endothelial cells under flow conditions: role of platelet glycoproteins P-selectin and GPIIb-IIIa. *Br J Cancer* **1998** 77: 2069-75.
107. Yu Y, Zhou XD, Liu YK, Ren N, Chen J, Zhao Y. Platelets promote the adhesion of human hepatoma cells with a highly metastatic potential to extracellular matrix protein: involvement of platelet P-selectin and GP IIb-IIIa. *J Cancer Res Clin Oncol* **2002** 128: 283-7.
108. Humphries MJ, Symonds EJ, Mould AP. Mapping functional residues onto integrin crystal structures. *Curr Opin Struct Biol* **2003** 13: 236-43.
109. Mould AP. Getting integrins into shape: recent insights into how integrin activity is regulated by conformational changes. *J Cell Sci* **1996** 109: 2613-8.
110. Shimaoka M, Takagi J, Springer TA. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **2002** 31: 485-516.
111. Humphries MJ. Integrin structure. *Biochem Soc Trans* **2000** 28: 311-39.

112. O'Toole TE, Katagiri Y, Faull RJ, Peter K, Tamura R, Quaranta V, Loftus JC, Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out transduction. *J Cell Biol* **1994** 124: 1047-59.
113. Kassner PD, Alon R, Springer TA, Hemler ME. Specialized Function Properties of the Integrin α^4 Cytoplasmic Domain. *Mol Biol Cell* **1995** 6: 661-74.
114. Löster K, Vossmeier D, Hofmann W, Reutter W, Danker K. α^1 Integrin cytoplasmic domain is involved in focal adhesion formation via association with intracellular proteins. *Biochem J* **2001** 356: 233-40.
115. van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* **2001** 305: 285-98.
116. Lee JO, Bankston LA, Arnaout MA, Liddington RC. Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure* **1995** 3: 1333-40.
117. Shimaoka M, Lu C, Palframan R, von Andrian UH, Takagi J, Springer TA. Reversibly locking a protein fold in an active conformation with a disulfide bond: integrin α^L I domains with high affinity and antagonist activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001** 98: 6009-14.
118. Dustin ML, Springer TA. T-cell receptor cross linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* **1989** 341: 619-24.
119. Beglova N, Blackow SC, Takagi J, Springer TA. Cysteine-rich structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nat Struct Biol* **2002** 9: 282-7.
120. Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **2005** 5: 546-59.
121. Carman CV, Springer TA. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol* **2003** 15: 547-56.
122. Bazzoni G, Hemler ME. Are changes in integrin affinity and conformation overemphasized? *Trends Biochem Sci* **1998** 23: 30-4.
123. Zwartz G, Chigaev A, Foutz T, Larson RS, Posner R, Sklar LA. Relationship between molecular and cellular dissociation rates for VLA-4/VCAM-1 interaction in the absence of shear stress. *Biophys J* **2004** 86: 1243-52.
124. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **1992** 69: 11-25.
125. Giancotti FP, Ruoslahti E. Integrin Signaling. *Science* **1999** 285: 1028-32.
126. Hato T, Pampori N, Shattil SJ. Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling functions of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J Cell Biol* **1998** 141: 1685-95.
127. Hemler ME, Huang C, Schwarz L. The VLA Protein Family. *J Biol Chem* **1987** 262: 3300-9.
128. Hemler ME, Huang C, Takada Y, Schwarz L, Strominger JL, Clabby ML. Characterization of the Cell Surface Heterodimer VLA-4 and Related Peptides. *J Biol Chem* **1987** 262: 11478-85.
129. Takada Y, Elices MJ, Crouse C, Hemler ME. The primary structure of the α^4 subunit of VLA-4: homology to other integrins and a possible cell-cell adhesion function. *EMBO J* **1989** 8: 1361-8.
130. Holzmann B, McIntyre BW, Weissman IL. Identification of a murine Peyer's patch-specific lymphocyte homing receptor as an integrin molecule with an α chain homologous to human VLA-4 α . *Cell* **1989** 56: 37-46.
131. Smith MJ, Berg EL, Lawrence MB. A direct comparison of selectin-mediated transient, adhesive events using high temporal resolution. *Biophys J* **1999** 77: 3371-83.
132. Alon R, Kassner PD, Woldemar Carr M, Finger EB, Hemler ME, Springer TA. The Integrin VLA-4 Supports Tethering and Rolling in Flow on VCAM-1. *J Cell Biol* **1995** 128: 1243-53.

133. Chen C, Mobley JL, Dwir O, Shimron F, Grabovsky V, Lobb RR, Shimizu Y, Alon R. High affinity very late antigen-4 subsets expressed on T cells are mandatory for spontaneous adhesion strengthening but not for rolling on VCAM-1 in shear flow. *J Immunol* **1999** 162: 1084-95.
134. Taichman DB, Cybulsky MI, Djaffar I, Longenecker M, Teixidó J, Rice GE, Aruffo A, Bevilacqua MP. Tumor cell surface $\alpha^4\beta_1$ integrin mediates adhesion to vascular endothelium: demonstration of an interaction with the N-terminal domains of INCAM-110/VCAM-1. *Cell Reg* **1991** 2: 347-55.
135. Amzel LM, Poljak RJ. Three-dimensional structure of Igs. *Ann Rev Biochem* **1979** 48: 961-97.
136. Hill RJ, Delaney R, Fellows RE, Lebovitz HE. The evolutionary origins of T cell receptors. *Sem Immunol* **1966** 6: 361-3.
137. González-Amaro R, Díaz-González F, Sánchez-Madrid F. Adhesion molecules in inflammatory disease. *Drugs* **1998** 56: 977-88.
138. Rice GE, Munro JM, Bevilacqua MP. Inducible cell adhesion molecule 110 (INCAM 110) is an endothelial receptor for lymphocytes. A CD11/CD18-independent mechanism. *J Exp Med* **1990** 171: 1369-74.
139. Rice GE, Bevilacqua MP. An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science* **1989** 246: 1303-6.
140. Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyi S, Chi-Rosso G, Lobb R. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* **1989** 59: 1203-11.
141. Jones EY, Harlos K, Bottomley MJH, Robinson RC. Crystal structure of an integrin-binding fragment of vascular cell adhesion molecule-1 at 1,8 Å resolution. *Nature* **1995** 360: 232-9.
142. Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyi S, Hemler ME, Lobb RR. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* **1990** 60: 577-84.
143. Rice GE, Munro JM, Corless C, Bevilacqua MP. Vascular and nonvascular expression of INCAM-110: A target for mononuclear leukocyte adhesion in normal and inflamed human tissues. *Am J Pathol* **1991** 138: 385-93.
144. Hooper NM, Karran EH, Turner AJ. Membrane protein secretases. *Biochem J* **1997** 321: 265-79.
145. Garton KJ, Gough PJ, Philalay J, Wille PT, Blobel CP, Whitehead RH, Dempsey PJ, Raines EW. Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM 17). *J Biol Chem* **2003** 278: 37459-64.
146. Levesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK, Haylock DN, Simmons PJ. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **2001** 98: 1289-97.
147. Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* **1993** 14: 506-12.
148. Polte T, Newman W, Gopal TV. Full length vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *Nucl Acids Res* **1990** 18: 5901.
149. Cybulsky MI, Fries JWU, Williams AJ, Sultan P, Davis VM, Gimbrone MA, Jr., Collins T. Alternative Splicing of Human VCAM-1 in Activated Vascular Endothelium. *Am J Pathol* **1991** 138: 815-20.
150. Hession C, Tizard R, Vassallo C, Schiffer SB, Goff D, Moy P, Chi-Rosso G, Luhowskyi S, Lobb R, Osborn L. Cloning of an Alternate Form of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem* **1991** 266: 6682-5.
151. Barthel SR, Johansson MW, Annis DS, Mosher DF. Cleavage of human 7-domain VCAM-1 (CD106) by thrombin. *Thromb Haemost* **2006** 95: 873-80.

152. Abe Y, Ballantyne CM, Smith CW. Functions of domain 1 and 4 of vascular cell adhesion molecule-1 in $\alpha 4$ integrin-dependent adhesion under static and flow conditions are differentially regulated. *J Immunol* **1996** 157: 5061-9.
153. Takeichi M, Watabe M, Shibamoto S, Ito F, Oda H, Uemura T, Shimamura K. Dynamic control of cell-cell adhesion for multicellular organization. *C. R. Acad Sci III* **1993** 316: 813-21.
154. Achen MG, McColl BK, Stacker SA. Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis. *Cancer Cell* **2005** 7: 121-7.
155. Liotta LA, Kleinermann J, Saidel GM. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following TC implantation. *Cancer Res* **1974** 34: 997-1004.
156. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* **2007** 7: 834-46.
157. Kannagi R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci* **2004** 95: 377-84.
158. Hajra KM, Fearon ER. Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **2002** 34: 255-68.
159. Westermarck J, Kähäri VM. Regulation of metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb J* **1999** 13: 781-92.
160. Mittelman L, Levin S, Verschueren H, De Baetselier P, Korenstein R. Direct correlation between cell membrane fluctuations, cell filterability, and the metastatic potential of lymphoid cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **1994** 203: 899-906.
161. Berger M, Motta C, Boiret N, Aublet-Cuvelier B, Bonhomme J, Travade P. Membrane fluidity and adherence to extracellular matrix components are related to blast cell count in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* **1994** 15: 297-302.
162. Friedl P, Bröcker EB. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* **2000** 57: 41-64.
163. Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, Meuwissen R, Van Garderen E, Peeper DS. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neutrotrophic receptor TrkB. *Nature* **2004** 430: 1034-40.
164. Paget D. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* **1889** 1: 571-3.
165. Ewing J. Neoplastic diseases. *Saunders Edit* **1928** Philadelphia.
166. Trousseau A. Phlegmasia alba dolens. *Clinique Medicale de L'Hotel-Dieu Paris* **1865** London: New Sydenham Society: 94-6.
167. Baron JA, Gridley G, Weiderpass E, Nyren O, Linet M. Venous thromboembolism and cancer. *Lancet* **1998** 351: 1077-80.
168. Sorensen HT, Mellekjaer L, Steffensen FH, Olsen JH, Nielsen GL. The risk of a diagnosis of cancer after primary deep venous thrombosis or pulmonary embolism. *N Engl J Med* **1998** 338: 1169-73.
169. Monreal M, Fernandez-Llamazares J, Perandreu J, Urrutia A, Sahuquillo JC, Contel E. Occult cancer in patients with venous thromboembolism: Which patients, which cancers. *Thromb Haemost* **1997** 78: 1316-8.
170. Gasic GJ, Gasic TB, Galanti N, Johnson T, Murphy S. Platelet-tumor-cell interactions in mice. The role of platelets in the spread of malignant disease. *Int J Cancer* **1973** 11: 704-18.
171. Jurasz P, Alonso-Escolano D, Radomski MW. Platelet-cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. *Br J Pharmacol* **2004** 143: 819-26.
172. Wahrenbrock M, Borsig L, Le D, Varki N, Varki A. Selectin-mucin interactions as a probable molecular explanation for the association of Trousseau syndrome with mucinous adenocarcinomas. *J Clin Invest* **2003** 112: 853-62.

173. Alonso-Escolano D, Strongin AY, Chung AW, Deryugina EI, Radomski MW. Membrane type-1 matrix metalloproteinase stimulates tumour cell-induced platelet aggregation: role of receptor glycoproteins. *Br J Pharmacol* **2004** 141: 241-52.
174. Karpatkin S, Pearlstein E. Role of platelets in tumor cell metastases. *Ann Intern Med* **1981** 95: 636-41.
175. Gupta GP, Massagué J. Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link. *J Clin Invest* **2004** 114: 1691-3.
176. Sato M, Narita T, Kimura N, Zenita K, Hashimoto T, Manabe T, Kannagi R. The association of sialyl Lewis(a) antigen with the metastatic potential of human colon cancer cells. *Anticancer Res* **1997** 17: 3505-11.
177. Orntoft TF, Vestergaard EM. Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Electrophoresis* **1999** 20: 362-71.
178. Eichbaum MH, de Rossi TM, Kaul S, Bastert G. Serum levels of soluble E-selectin are associated with the clinical course of metastatic disease in patients with liver metastases from breast cancer. *Oncol Res* **2004** 14: 603-10.
179. Kapelko-Slowik K, Jazwiec B, Mirosław S, Wolowiec D, Urbaniak-Kujda D, Tomaszewska-Toporska B, Potoczek S, Ciszak L, Kuliczowski K. [Plasma concentration of the shed form of L-selectin (sL-selectin) in patients with acute myeloblastic leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL) and its relation to the clinical course]. *Pol Arch Med Wewn* **2004** 112: 1283-8.
180. Dymicka-Piekarska V, Butkiewicz A, Matowicka-Karna J, Kemona H. Soluble P-selectin concentration in patients with colorectal cancer. *Neoplasma* **2005** 52: 297-301.
181. Takada A, Ohmori K, Takahashi N, Tsuyuoka K, Yago A, Zenita K, Hasegawa A, Kannagi R. Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis A. *Biochem Biophys Res Commun* **1991** 179: 713-9.
182. Zhang K, Baeckstrom D, Hansson GC. A secreted mucin carrying sialyl-Lewis a from colon carcinoma cells binds to E-selectin and inhibits HL-60 cell adhesion. *Int J Cancer* **1994** 59: 823-9.
183. Matsuura N, Narita T, Hiraiwa N, Hiraiwa M, Murai H, Iwase T, Funahashi H, Imai T, Takagi H, Kannagi R. Gene expression of fucosyl- and sialyl-transferases which synthesize sialyl Lewisx, the carbohydrate ligands for E-selectin, in human breast cancer. *Int J Oncol* **1998** 12: 1157-64.
184. Hanley WD, Burdick MM, Konstantopoulos K, Sackstein R. CD44 on LS174T colon carcinoma cells possesses E-selectin ligand activity. *Cancer Res* **2005** 65: 5812-7.
185. Kannagi R. Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconj J* **1997** 14: 577-84.
186. Kim YJ, Varki A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj J* **1997** 14: 569-76.
187. Kawano T, Yanoma S, Nakamura Y, Shiono O, Kokatu T, Kubota A, Furukawa M, Tsukuda M. Evaluation of soluble adhesion molecules CD44 (CD44st, CD44v5, CD44v6), ICAM-1, and VCAM-1 as tumor markers in head and neck cancer. *Am J Otolaryngol* **2005** 26: 308-13.
188. Hanley WD, Napier SL, Burdick MM, Schnaar RL, Sackstein R, Konstantopoulos K. Variant isoforms of CD44 are P- and L-selectin ligands on colon carcinoma cells. *Faseb J* **2006** 20: 337-9.
189. Alves CS, Burdick MM, Thomas SN, Pawar P, Konstantopoulos K. The Dual Role of CD44 as a Functional P-selectin and Fibrin Ligand in Colon Carcinoma Cell Adhesion. *Am J Physiol Cell Physiol* **2008** 294: C907-16.
190. Leppanen A, Mehta P, Ouyang YB, Ju T, Helin J, Moore KL, van Die I, Canfield WM, McEver RP, Cummings RD. A novel glycosulfopeptide binds to P-selectin and inhibits leukocyte adhesion to P-selectin. *J Biol Chem* **1999** 274: 24838-48.

191. St Hill CA, Bullard KM, Walcheck B. Expression of the high-affinity selectin glycan ligand C2-O-sLeX by colon carcinoma cells. *Cancer Lett* **2005** 217: 105-13.
192. Lauri D, Needham L, Martin-Padura I, Dejana E. Tumor cell adhesion to endothelial cells: endothelial leukocyte adhesion molecule-1 as an inducible adhesive receptor specific for colon carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* **1991** 83: 1321-4.
193. Dimitroff CJ, Lechpammer M, Long-Woodward D, Kutok JL. Rolling of human bone-metastatic prostate tumor cells on human bone marrow endothelium under shear flow is mediated by E-selectin. *Cancer Res* **2004** 64: 5261-9.
194. Giavazzi R, Foppolo M, Dossi R, Remuzzi A. Rolling and adhesion of human tumor cells on vascular endothelium under physiological flow conditions. *J Clin Invest* **1993** 92: 3038-44.
195. Tözeren A, Kleinman HK, Grant DS, Morales D, Mercurio AM, Byers SW. E-selectin-mediated dynamic interactions of breast- and colon-cancer cells with endothelial-cell monolayers. *Int J Cancer* **1995** 60: 426-31.
196. Goetz DJ, Brandley BK, Hammer DA. An E-selectin-IgG chimera supports sialylated moiety dependent adhesion of colon carcinoma cells under fluid flow. *Ann Biomed Eng* **1996** 24: 87-98.
197. Biancone L, Araki M, Araki K, Vassalli P, Stamenkovic I. Redirection of tumor metastasis by expression of E-selectin in vivo. *J Exp Med* **1996** 183: 581-7.
198. Gout S, Tremblay PL, Huot J. Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis. *Clin Exp Metastasis* **2007**.
199. Morgan DW, Forssmann UJ, Nakada MT. *Cancer and Inflammation*. Birkhäuser Verlag: Basel, **2004**.
200. Glinskii OV, Turk JR, Pienta KJ, Huxley VH, Glinsky VV. Evidence of porcine and human endothelium activation by cancer-associated carbohydrates expressed on glycoproteins and tumour cells. *J Physiol* **2004** 554: 89-99.
201. Khatib AM, Auguste P, Fallavollita L, Wang N, Samani A, Kontogiannea M, Meterrissian S, Brodt P. Characterization of the host proinflammatory response to tumor cells during the initial stages of liver metastasis. *Am J Pathol* **2005** 167: 749-59.
202. Monzavi-Karbassi B, Whitehead TL, Jousheghany F, Artaud C, Hennings L, Shaaf S, Slaughter A, Korourian S, Kelly T, Blaszczyk-Thurin M, Kieber-Emmons T. Deficiency in surface expression of E-selectin ligand promotes lung colonization in a mouse model of breast cancer. *Int J Cancer* **2005** 117: 398-408.
203. Roselli M, Mineo TC, Martini F, Mariotti S, Ambrogi V, Spila A, D'Alessandro R, Basili S, Guadagni F, Ferroni P. Soluble selectin levels in patients with lung cancer. *Int J Biol Markers* **2002** 17: 56-62.
204. Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Sekara E, Michail P, Rosenberg T, Diamantis T. Clinical significance of serum levels of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in gastric cancer patients. *Am J Gastroenterol* **2003** 98: 478-85.
205. Nair KS, Naidoo R, Chetty R. Expression of cell adhesion molecules in oesophageal carcinoma and its prognostic value. *J Clin Pathol* **2005** 58: 343-51.
206. Aruffo A, Dietsch MT, Wan H, Hellstrom KE, Hellstrom I. Granule membrane protein 140 (GMP140) binds to carcinomas and carcinoma-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992** 89: 2292-6.
207. Goetz DJ, Ding H, Atkinson WJ, Vachino G, Camphausen RT, Cumming DA, Lucinskas FW. A human colon carcinoma cell line exhibits adhesive interactions with P-selectin under fluid flow via a PSGL-1-independent mechanism. *Am J Pathol* **1996** 149: 1661-73.
208. Ma YQ, Geng JG. Heparan sulfate-like proteoglycans mediate adhesion of human malignant melanoma A375 cells to P-selectin under flow. *J Immunol* **2000** 165: 558-65.

209. Hanley W, McCarty O, Jadhav S, Tseng Y, Wirtz D, Konstantopoulos K. Single molecule characterization of P-selectin/ligand binding. *J Biol Chem* **2003** 278: 10556-61.
210. Monzavi-Karbassi B, Stanley JS, Hennings L, Jousheghany F, Artaud C, Shaaf S, Kieber-Emmons T. Chondroitin sulfate glycosaminoglycans as major P-selectin ligands on metastatic breast cancer cell lines. *Int J Cancer* **2007** 120: 1179-91.
211. Kaytes PS, Geng JG. P-selectin mediates adhesion of the human melanoma cell line NKI-4: identification of glycoprotein ligands. *Biochemistry* **1998** 37: 10514-21.
212. Ma YQ, Geng JG. Obligatory requirement of sulfation for P-selectin binding to human salivary gland carcinoma Acc-M cells and breast carcinoma ZR-75-30 cells. *J Immunol* **2002** 168: 1690-6.
213. Aigner S, Ramos CL, Hafezi-Moghadam A, Lawrence MB, Friederichs J, Altevogt P, Ley K. CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *Faseb J* **1998** 12: 1241-51.
214. Ludwig RJ, Boehme B, Podda M, Henschler R, Jager E, Tandl C, Boehncke WH, Zollner TM, Kaufmann R, Gille J. Endothelial P-selectin as a target of heparin action in experimental melanoma lung metastasis. *Cancer Res* **2004** 64: 2743-50.
215. Nooijen PTGA, Westphal JR, Eggermont AMM, Schalkwijk C, Max R, de Waal RMW, Ruiter DJ. Endothelial P-Selectin Expression Is Reduced in Advanced Primary Melanoma and Melanoma Metastasis. *Am J Pathol* **1998** 152: 679-82.
216. Peeters CF, Ruers TJ, Westphal JR, de Waal RM. Progressive loss of endothelial P-selectin expression with increasing malignancy in colorectal cancer. *Lab Invest* **2005** 85: 248-56.
217. Schadendorf D, Heide J, Gawlik C, Suter L, Czarnetzki BM. Association With Clinical Outcome of Expression of VLA-4 in Primary Cutaneous Malignant Melanoma as Well as P-selectin and E-selectin on Intratumoral Vessels. *J Natl Cancer Inst* **1995** 87: 366-71.
218. Stone JP, Wagner DD. P-selectin mediates adhesion of platelets to neuroblastoma and small cell lung cancer. *J Clin Invest* **1993** 92: 804-13.
219. Karpatkin S, Pearlstein E, Ambrogio C, Collier BS. Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo. *J Clin Invest* **1988** 81: 1012-9.
220. Boukerche H, Berthier-Vergnes O, Tabone E, Dore JF, Leung LL, McGregor JL. Platelet-melanoma cell interaction is mediated by the glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* **1989** 74: 658-63.
221. Nierodzik ML, Klepfish A, Karpatkin S. Role of platelets, thrombin, integrin IIb-IIIa, fibronectin and von Willebrand factor on tumor adhesion in vitro and metastasis in vivo. *Thromb Haemost* **1995** 74: 282-90.
222. Kim YJ, Borsig L, Varki NM, Varki A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998** 95: 9325-30.
223. Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002** 99: 2193-8.
224. Drillenburger P, Pals ST. Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. *Blood* **2000** 95: 1900-10.
225. Belanger SD, St-Pierre Y. Role of selectins in the triggering, growth, and dissemination of T-lymphoma cells: implication of L-selectin in the growth of thymic lymphoma. *Blood* **2005** 105: 4800-6.
226. Qian F, Hanahan D, Weissman IL. L-selectin can facilitate metastasis to lymph nodes in a transgenic mouse model of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001** 98: 3976-81.

227. Mannori G, Crottet P, Cecconi O, Hanasaki K, Aruffo A, Nelson RM, Varki A, Bevilacqua MP. Differential colon cancer cell adhesion to E-, P-, and L-selectin: role of mucin-type glycoproteins. *Cancer Res* **1995** 55: 4425-31.
228. Yamada M, Yanaba K, Hasegawa M, Matsushita Y, Horikawa M, Komura K, Matsushita T, Kawasuji A, Fujita T, Takehara K, Steeber DA, Tedder TF, Sato S. Regulation of local and metastatic host-mediated anti-tumour mechanisms by L-selectin and intercellular adhesion molecule-1. *Clin Exp Immunol* **2006** 143: 216-27.
229. Yamada M, Yanaba K, Takehara K, Sato S. Clinical significance of serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 and soluble L-selectin in malignant melanoma. *Arch Dermatol Res* **2005** 297: 256-60.
230. Izycka A, Jablonska E, Izycki T, Chyczewska E. Expression of adhesion molecules LFA-1 and L-selectin on PNM and level of soluble sE-selectin and sL-selectin in the serum of patients with small cell lung cancer. *Pneumonol Allergol Pol* **2002** 70: 403-8.
231. Kim YJ, Borsig L, Han HL, Varki NM, Varki A. Distinct selectin ligands on colon carcinoma mucins can mediate pathological interactions among platelets, leukocytes, and endothelium. *Am J Pathol* **1999** 155: 461-72.
232. Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med* **2000** 6: 100-2.
233. Läubli H, Stevenson JL, Varki A, Varki NM, Borsig L. L-selectin facilitation of metastasis involves temporal induction of Fut7-dependent ligands at sites of tumor cell arrest. *Cancer Res* **2006** 66: 1536-42.
234. Borsig L. Selectins facilitate carcinoma metastasis and heparin can prevent them. *News Physiol Sci* **2004** 19: 16-21.
235. Silva HC, Garcao F, Coutinho EC, De Oliveira CF, Regateiro FJ. Soluble VCAM-1 and E-selectin in breast cancer: relationship with staging and with the detection of circulating cancer cells. *Neoplasma* **2006** 53: 538-43.
236. Ding YB, Chen GY, Xia JG, Zhang XW, Yang HY, Yang L. Association of VCAM-1 overexpression with oncogenesis, tumor angiogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* **2003** 9: 1409-14.
237. Wu TC. The role of vascular cell adhesion molecule-1 in tumor immune evasion. *Cancer Res* **2007** 67: 6003-6.
238. Sasaki K, Xinmei Z, Vasquez C, Nishimura F, Dusak JE, Huang J, Mitsugu F, Wesa A, Potter DM, Walker PR, Storkus WJ, Okada H. Preferential Expression of Very Late Antigen-4 on Type 1 CTL Cells Plays a Critical Role in Trafficking into Central Nervous System Tumors. *Cancer Res* **2007** 67: 6451-8.
239. Shioi K, Komiya A, Hattori K, Huang Y, Sano F, Murakami T, Nakaigawa N, Kishida T, Kubota Y, Nagashima Y, Yao M. Vascular cell adhesion molecule 1 predicts cancer-free survival in clear cell renal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* **2006** 12: 7339-46.
240. Jin H, Aiyer A, Su J, Borgstrom P, Stupack D, Friedlander M, Varner J. A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature. *J Clin Invest* **2006** 116: 652-62.
241. Mattila P, Majuri ML, Renkonen R. VLA-4 integrin on sarcoma cell lines recognizes endothelial VCAM-1. Differential regulation of the VLA-4 avidity on various sarcoma cell lines. *Int J Cancer* **2006** 52: 918-23.
242. Martin-Padura I, Mortarini R, Lauri D, Bernasconi S, Sanchez-Madrid F, Parmiani G, Mantovani A, Anichini A, Dejana E. Heterogeneity in Human Melanoma Cell Adhesion to Cytokine Activated Endothelial Cells Correlates with VLA-4 Expression. *Cancer Res* **1991** 51: 2239-41.

243. Klemke M, Weschenfelder T, Konstandin MH, Samstag Y. High affinity interaction of integrin $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers. *J Cell Physiol* **2007** 212: 368-74.
244. Okahara H, Yagita H, Miyake K, Okumura K. Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis. *Cancer Res* **1994** 54: 3233-6.
245. Garofalo A, Chirivi RG, Foglieni C, Pigott R, Mortarini R, Martin-Padura I, Anichini A, Gearing AJ, Sanchez-Madrid F, Dejana E, et al. Involvement of the very late antigen 4 integrin on melanoma in interleukin 1-augmented experimental metastases. *Cancer Res* **1995** 55: 414-9.
246. Higashiyama A, Watanabe H, Okumura K, Yagita H. Involvement of tumor necrosis factor alpha and very late activation antigen 4/vascular cell adhesion molecule 1 interaction in surgical-stress-enhanced experimental metastasis. *Cancer Immunol Immunother* **1996** 42: 231-6.
247. Qian F, Vaux DL, Weissman IL. Expression of the integrin alpha 4 beta 1 on melanoma cells can inhibit the invasive stage of metastasis formation. *Cell* **1994** 77: 335-47.
248. Hart IR, Birch M, Marshall JF. Cell adhesion receptor expression during melanoma progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **1991** 10: 115-28.
249. Ferrer P, Asensi M, Segarra R, Ortega A, Benlloch M, Obrador E, Varea MT, Asensio G, Jorda L, Estrela JM. Association between pterostilbene and quercetin inhibits metastatic activity of B16 melanoma. *Neoplasia* **2005** 7: 37-47.
250. Piantelli M, Rossi C, Iezzi M, La Sorda R, Iacobelli S, Alberti S, Natali PG. Flavonoids Inhibit Melanoma Lung Metastasis by Impairing Tumor Cells Endothelium Interaction. *J Cell Physiol* **2006** 207: 23-9.
251. Ledezma E, Aritz-Castro R, Cardier J. Apoptotic and anti-adhesion effect of ajoene, a garlic derived compound, on the murine melanoma B16F10 cells: possible role of caspase-3 and the alpha(4)beta(1) integrin. *Cancer Lett* **2004** 206: 35-41.
252. Jachimczak P, Apfel R, Bosserhoff AK, Fabel K, Hau P, Tschertner I, Wise P, Schlingensiepen KH, Schuler-Thurner B, Bogdahn U. Inhibition of immunosuppressive effects of melanoma-inhibiting activity (MIA) by antisense techniques. *Int J Cancer* **2005** 113: 88-92.
253. Bauer R, Humphries M, Fassler R, Winklmeier A, Craig SE, Bosserhoff AK. Regulation of integrin activity by MIA. *J Biol Chem* **2006** 281: 11669-77.
254. Chang LL, Truong Q, Doss GA, MacCoss M, Lyons K, McCauly E, Mumford R, Forrest G, Vincent S, Schmidt JA, Hagmann WK. Highly constrained bicyclic VLA-4 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* **2007** 17: 597-601.
255. Saku O, Ohta K, Arai E, Nomoto Y, Miura H, Nakamura H, Fuse E, Nakasato Y. Synthetic study of VLA-4/VCAM-1 inhibitors: Synthesis and structure-activity relationship of piperazinyphenylalanine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **2008** 18: 1053-7.
256. Simanek EE, McGarvey GJ, Jablonowski JA, Wong CH. Selectin-Carbohydrate Interactions: From Natural Ligands to Designed Mimics. *Chem Rev* **1998** 98: 833-862.
257. Kogan TP, Dupre' B, Bui H, McAbee KL, Kassir JM, Scott IL, Hu X, Vanderslice P, Beck PJ, Dixon RAF. Novel Synthetic Inhibitors of Selectin-Mediated Cell Adhesion: Synthesis of 1,6-Bis-[3-(3-carboxymethylphenyl)-4-(2-a-D-mannopyranosyl)phenyl]hexane (TBC1269). *J Med Chem* **1998** 41: 1099-1111.

258. Kranich R, Busemann AS, Bock D, Schroeter-Maas S, Beyer D, Heinemann B, Meyer M, Schierhorn K, Zahlten R, Wolff G, Aydt EM. Rational design of novel, potent small molecule pan-selectin antagonists. *J Med Chem* **2007** 50: 1101-15.
259. Schön MP, Krahn T, Schon M, Rodriguez ML, Antonicek H, Schultz JE, Ludwig RJ, Zollner TM, Bischoff E, Bremm KD, Schramm M, Henninger K, Kaufmann R, Gollnick HP, Parker CM, Boehncke WH. Efomycine M, a new specific inhibitor of selectin, impairs leukocyte adhesion and alleviates cutaneous inflammation. *Nat Med* **2002** 8: 366-72.
260. Hayward R, Campbell B, Shin YK, Scalia R, Lefer AM. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 protects against myocardial ischemic reperfusion injury in cats. *Cardiovasc Res* **1999** 41: 65-76.
261. Diaz-Ricart M, Bozzo J. rPSGL-Ig. *Drugs of the Future* **2002** 27: 346-9.
262. Huang CC, Lu YF, Wen SN. A novel apoptosis-inducing anti-PSGL-1 antibody for T-cell mediated diseases. *Eur J Immunol* **2005** 35: 2239-49.
263. Ali M, Hicks AE, Hellewell PG, Thoma G, Norman KE. Polymers bearing sLex-mimetics are superior inhibitors of E-selectin-dependent leukocyte rolling in vivo. *Faseb J* **2004** 18: 152-4.
264. Bruehl RE, Dasgupta F, Katsumoto TR, Tan JH, Bertozzi CR, Spevak W, Ahn DJ, Rosen SD, Nagy JO. Polymerized liposome assemblies: bifunctional macromolecular selectin inhibitors mimicking physiological selectin ligands. *Biochemistry* **2001** 40: 5964-74.
265. Kakiuchi Y, Tsuji S, Tsujii M, Murata H, Kawai N, Yasumaru M, Kimura A, Komori M, Irie T, Miyoshi E, Sasaki Y, Hayashi N, Kawano S, Hori M. Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. *Cancer Res* **2002** 62: 1567-72.
266. Kobayashi K, Matsumoto S, Morishima T, Kawabe T, Okamoto T. Cimetidine inhibits cancer cell adhesion to endothelial cells and prevents metastasis by blocking E-selectin expression. *Cancer Res* **2000** 60: 3978-84.
267. Zeisig R, Stahn R, Wenzel K, Behrens D, Fichtner I. Effect of sialyl Lewis X-glycoliposomes on the inhibition of E-selectin-mediated tumour cell adhesion in vitro. *Biochim Biophys Acta* **2004** 1660: 31-40.
268. Bloom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA* **2005** 293: 715-22.
269. Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Kuderer NM, Lyman GH. Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. *J Thromb Haemost* **2007** 5: 632-4.
270. Sorensen HAT, Mellekjaer L, Olsen JH, Baron JA. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *N Engl J Med* **2000** 343: 1846-50.
271. Bijsterveld NR, Hettiarachchi RJK, Peters R, Prins MH, Levi M, Büller HR. Low-molecular weight heparins in venous and arterial thrombotic disease. *Thromb Haemost* **1999** 82: 139-47.
272. Lee AY, Levine MN, Baker RI, Bowden C, Kakkar AK, Prins M, Rickles FR, Julian JA, Haley S, Kovacs MJ, Gent M. Low-molecular-weight heparin versus a coumarin for the prevention of recurrent venous thromboembolism in patients with cancer. *N Engl J Med* **2003** 349: 146-53.
273. Meyer G, Marjanovic Z, Valcke J, Lorcerie B, Gruel Y, Solal-Celigny P, Le Maignan C, Extra JM, Cottu P, Farge D. Comparison of Low-Molecular-Weight-Heparin and Warfarin for the Secondary Prevention of Venous Thromboembolism in Patients With Cancer. *Arch Intern Med* **2002** 162: 1729-35.
274. Brose KMJ, Lee AYY. Cancer-associated thrombosis: prevention and treatment. *Curr Oncol* **2008** 15: 58-67.
275. Michaels L. Cancer incidence and mortality in patients having anticoagulant therapy. *Lancet* **1964** 22: 832-5.

276. Zacharski LR, Henderson WG, Rickles FR. Effect of warfarin on survival in small cell carcinoma of the lung. *JAMA* **1981** 245: 831-5.
277. Smorenburg SM, Vink R, Otten HM. The effect of vitamin K antagonists on survival of patients with malignancy: a systematic analysis. *Thromb Haemost* **2001** 86: 1586-7.
278. Zacharski LR, Ornstein DL. Heparin and cancer. *Thromb Haemost* **1998** 80: 10-23.
279. Lebeau B, Chastang C, Brechot JM, Capron F, Dautzenberg B, Delaisements C, Mornet M, Brun J, Hurdebourcq JP, Lemaine E. Subcutaneous heparin treatment increases survival in small cell lung cancer. *Cancer* **1994** 74: 38-44.
280. Smorenburg SM, Hettiarachchi RJ, Vink R, Buller HR. The effects of unfractionated heparin on survival in patients with malignancy--a systematic review. *Thromb Haemost* **1999** 82: 1600-4.
281. Siragusa S, Cosmi B, Piovella F, Hirsh J, Ginsberg JS. Low-molecular-weight heparin and unfractionated heparin in the treatment of patients with acute venous thromboembolism: result of a meta-analysis. *Am J Med* **1996** 100: 269-77.
282. Hettiarachchi RJ, Smorenburg SM, Ginsberg J, Levine M, Prins MH, Buller HR. Do heparins do more than just treat thrombosis? The influence of heparins on cancer spread. *Thromb Haemost* **1999** 82: 947-52.
283. von Tempelhoff GF, Harenberg J, Niemann F, Hommel G, Kirkpatrick CJ, Heilmann L. Effect of low molecular weight heparin (Certoparin) versus unfractionated heparin on cancer survival following breast and pelvic cancer surgery: A prospective randomized double-blind trial. *Int J Oncol* **2000** 16: 815-24.
284. Kakkar AK, Levine MN, Kadziola Z, Lemoine NR, Low V, Patel HK, Rustin G, Thomas M, Quigley M, Williamson RC. Low molecular weight heparin, therapy with dalteparin, and survival in advanced cancer: the fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS). *J Clin Oncol* **2004** 22: 1944-8.
285. Altinbas M, Coskun HS, Er O, Ozkan M, Eser B, Unal A, Cetin M, Soyuer S. A randomized clinical trial of combination chemotherapy with and without low-molecular-weight heparin in small cell lung cancer. *J Thromb Haemost* **2004** 2: 1266-71.
286. Klerk CP, Smorenburg SM, Otten HM, Lensing AW, Prins MH, Piovella F, Prandoni P, Bos MM, Richel DJ, van Tienhoven G, Buller HR. The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy. *J Clin Oncol* **2005** 23: 2130-5.
287. Lee AY, Rickles FR, Julian JA, Gent M, Baker RI, Bowden C, Kakkar AK, Prins M, Levine MN. Randomized comparison of low molecular weight heparin and coumarin derivatives on the survival of patients with cancer and venous thromboembolism. *J Clin Oncol* **2005** 23: 2123-9.
288. Niers TM, Klerk CP, DiNisio M, Van Noorden CJ, Buller HR, Reitsma PH, Richel DJ. Mechanisms of heparin induced anti-cancer activity in experimental cancer models. *Crit Rev Oncol Hematol* **2007** 61: 195-207.
289. Sciumbata T, Caretto P, Pirovano P, Pozzi P, Cremonesi P, Galimberti G, Leoni F, Marcucci F. Treatment with modified heparins inhibits experimental metastasis formation and leads, in some animals, to long-term survival. *Invasion Metastasis* **1996** 16: 132-43.
290. Lapierre F, Holme K, Lam L, Tressler RJ, Storm N, Wee J, Stack RJ, Castellot J, Tyrrell DJ. Chemical modifications of heparin that diminish its anticoagulant but preserve its heparanase-inhibitory, angiostatic, anti-tumor and anti-metastatic properties. *Glycobiology* **1996** 6: 355-66.
291. Ono K, Ishihara M, Ishikawa K, Ozeki Y, Deguchi H, Sato M, Hashimoto H, Saito Y, Yura H, Kurita A, Maehara T. Periodate-treated, non-anticoagulant heparin-carrying polystyrene (NAC-HCPS) affects angiogenesis and inhibits subcutaneous induced tumor growth and metastasis to the lung. *Br J Cancer* **2002** 86: 1803-12.

292. Yoshitomi Y, Nakanishi H, Kusano Y, Munesue S, Oguri K, Tatematsu M, Yamashina I, Okayama M. Inhibition of experimental lung metastases of Lewis lung carcinoma cells by chemically modified heparin with reduced anticoagulant activity. *Cancer Lett* **2004** 207: 165-74.
293. Kragh M, Binderup L, Vig Hjarnaa PJ, Bramm E, Johansen KB, Frimundt Petersen C. Non-anti-coagulant heparin inhibits metastasis but not primary tumor growth. *Oncol Rep* **2005** 14: 99-104.
294. Stevenson JL, Varki A, Borsig L. Heparin attenuates metastasis mainly due to inhibition of P- and L-selectin, but non-anticoagulant heparins can have additional effects. *Thromb Res* **2007** 120: 107-11.
295. Hostettler N, Naggi A, Torri G, Ishai-Michaeli R, Casu B, Vlodaysky I, Borsig L. P-selectin and heparanase-dependent antimetastatic activity of non-anticoagulant heparins. *Faseb J* **2007** 21: 3562-72.
296. Stevenson JL, Choi SH, Varki A. Differential metastasis inhibition by clinically relevant levels of heparins--correlation with selectin inhibition, not antithrombotic activity. *Clin Cancer Res* **2005** 11: 7003-11.
297. Skinner MP, Fournier DJ, Andrews RK, Gorman JJ, Chesterman CN, Berndt MC. Characterization of human platelet GMP-140 as a heparin-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* **1989** 164: 1373-9.
298. Skinner MP, Lucas CM, Burns GF, Chesterman CN, Berndt MC. GMP-140 binding to neutrophils is inhibited by sulfated glycans. *J Biol Chem* **1991** 266: 5371-4.
299. Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP. Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood* **1993** 82: 3253-8.
300. Norgard-Sumnicht KE, Varki NM, Varki A. Calcium-dependent heparin-like ligands for L-selectin in nonlymphoid endothelial cells. *Science* **1993** 261: 480-3.
301. Norgard-Sumnicht K, Varki A. Endothelial heparan sulfate proteoglycans that bind to L-selectin have glucosamine residues with unsubstituted amino groups. *J Biol Chem* **1995** 270: 12012-24.
302. Koenig A, Norgard-Sumnicht K, Linhardt R, Varki A. Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. *J Clin Invest* **1998** 101: 877-89.
303. Xie X, Rivier AS, Zakrzewicz A, Bernimoulin M, Zeng XL, Wessel HP, Schapira M, Spertini O. Inhibition of selectin-mediated cell adhesion and prevention of acute inflammation by nonanticoagulant sulfated saccharides. Studies with carboxyl-reduced and sulfated heparin and with trestatin a sulfate. *J Biol Chem* **2000** 275: 34818-25.
304. Gao Y, Li N, Fei R, Chen Z, Zheng S, Zeng X. P-Selectin-mediated acute inflammation can be blocked by chemically modified heparin, RO-heparin. *Mol Cells* **2005** 19: 350-5.
305. Wang L, Brown JR, Varki A, Esko JD. Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. *J Clin Invest* **2002** 110: 127-36.
306. Wei M, Tai G, Gao Y, Li N, Huang B, Zhou Y, Hao S, Zeng X. Modified heparin inhibits P-selectin-mediated cell adhesion of human colon carcinoma cells to immobilized platelets under dynamic flow conditions. *J Biol Chem* **2004** 279: 29202-10.
307. Höpfner M, Alban S, Schumacher G, Rothe U, Bendas G. Selectin-blocking semi-synthetic sulfated polysaccharides as promising anti-inflammatory agents. *J Pharm Pharmacol* **2003** 55: 697-706.

308. Borsig L, Wong R, Feramisco J, Nadeau DR, Varki NM, Varki A. Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001** 98: 3352-7.
309. Rickles FR. Mechanisms of Cancer-Induced Thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* **2006** 35: 103-10.
310. Mousa SA, Mohamed S. Inhibition of endothelial cell tube formation by the low molecular weight heparin, tinzaparin, is mediated by tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* **2004** 92: 627-33.
311. Jayson GC, Gallagher JT. Heparin oligosaccharides: inhibition of the biological activity of bFGF on Caco-2 cells. *Br J Cancer* **1997** 75: 9-16.
312. Chen M, Chen J, Lu J, Hong J, Chen W, Zhu J, Chen N, Geng J. Inhibition of bFGF gene expression and tumor angiogenesis of orthotopic implantation of human gastric carcinoma by N-desulfated heparin. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* **2008** 25: 78-81.
313. Edovitsky E, Elkin M, Zcharia E, Peretz T, Vlodayvsky I. Heparanase gene silencing, tumor invasiveness, angiogenesis, and metastasis. *J Natl Cancer Inst* **2004** 96: 1219-30.
314. Vlodayvsky I, Abboud-Jarrou G, Elkin M, Naggi A, Casu B, Sasisekharan R, Ilan N. The impact of heparanase and heparin on cancer metastasis and angiogenesis. *Pathophysiol Haemost Thromb* **2006** 35: 116-27.
315. Angelini A, Di Febbo C, Ciofani G, Di Nisio M, Baccante G, Di Ilio C, Cuccurullo F, Porreca E. Inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by unfractionated heparin: a new potential chemosensitizer for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* **2005** 4: 313-7.
316. Angelini A, Ciofani G, Baccante G, Di Febbo C, Carmine DI, Cuccurullo F, Porreca E. Modulatory effects of heparin on cellular accumulation and cytotoxicity of doxorubicin in MRP1-overexpressing HL60/doxo cells. *Anticancer Res* **2007** 27: 351-5.
317. Poste G, Doll J, Hart IR, Fidler IJ. *In vitro* selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. *Cancer Res* **1980** 40: 1636-44.
318. Montesano R, Pepper MS, Möhle-Steinlein M, Risau W, Wagner EF, Orci L. Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T oncogene. *Cell* **1990** 62: 435-45.
319. <http://www.lgpromochem-atcc.com/common/catalog/cellBiology/cellBiologyIndex.cfm>
320. Fogh J, editor. Human tumor cells in vitro. *New York: Plenum Press* **1975** 43: 115-59.
321. Jäger E, Karbach J, Gnjatic S, Jäger D, Maeurer M, Atmaca A, Arand M, Skipper J, Stockert E, Chen YT, Old LJ, Knuth A. Identification of a naturally processed NY-ESO-1 peptide recognized by CD8+ T cells in the context of HLA-B51. *Cancer Immun* **2002** 2: 12.
322. Sundstrom C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* **1976** 17: 565-77.
323. Ramos CL, Smith MJ, Snapp KR, Kansas GS, Stickney GW, Ley K, Lawrence MB. Functional characterization of L-selectin ligands on human neutrophils and leukemia cell lines: evidence for mucin-like ligand activity distinct from P-selectin glycoprotein-1. *Blood* **1998** 91: 1067-75.
324. Christ K. Die Simulation der antimikrobiellen Wirkung ausgewählter Lantibiotika mittels kombinierter Biosensortechniken. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn **2007**.

325. Ludwig RJ, Schultz JE, Boehncke WH, Podda M, Tandi C, Krombach F, Baatz H Kaufmann R, von Andrian UH, Zollner TM. Activated, not resting, platelets increase leukocyte rolling in murine skin utilizing a distinct set of adhesion molecules. *J Invest Dermatol* **2004** 122: 830-6.
326. Fritzsche J, Alban S, Ludwig RJ, Rubant S, Boehncke WH, Schumacher G, Bendas G. The influence of various structural parameters of semisynthetic sulfated polysaccharides on the P-selectin inhibitory capacity. *Biochem Pharmacol* **2006** 72: 474-85.
327. Ludwig RJ. unpublished data. **2004**.
328. Robert C, Fuhlbrigge RG, Kieffer JD, Ayehunie S, Hynes RO, Cheng G, Grabbe S, von Andrian UH, Kupper TS. Interaction of dendritic cells with skin endothelium: a new perspective on immunosurveillance. *J Exp Med* **1999** 189: 627-36.
329. Simonis D, Fritzsche J, Alban S, Bendas G. Kinetic Analysis of Heparin and Glucan Sulfates Binding to P-Selectin and Its Impact on the General Understanding of Selectin Inhibition. *Biochemistry* **2007** 46: 6156-64.
330. Aigner S. Funktionelle Analyse des CD24/P-Selektin-Bindungsweges. Dissertation, Universität Kaiserslautern **1997**.
331. Schumacher G, Höpfner M, Vogel J, Bakowsky U, Ikami T, Rothe U, Bendas G. Untersuchungen selektin-inhibierender Substanzen als potentiell antiinflammatorische Verbindungen. *Pharm Ind* **2002** 64: 808-15.
332. Coughlin SR. Thrombin receptor structure and function. *Thromb Haemost* **1993** 70: 184-7.
333. Ruggeri ZM. Mechanisms of shear induced platelet adhesion and aggregation. *Thromb Haemost* **1993** 70: 119-23.
334. Lahav J, Hynes RO. Involvement of fibronectin, von Willebrand factor, and fibrinogen in platelet interaction with solid substrate. *J Supramol Struct Cell Biochem* **1981** 17: 299-311.
335. Felding-Habermann B, Habermann R, Saldívar E, Ruggeri ZM. Role of $\beta 3$ Integrins in Melanoma Cell Adhesion to Activated Platelets under Flow. *J Biol Chem* **1996** 271: 5892-900.
336. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: Evidence for GPIIb/IIIa dependent bridging mechanism and novel roles for ICAM-1, $\alpha v \beta 3$ integrin, and GPI α . *J Exp Med* **1998** 187: 329-39.
337. Varki A, Varki NM. P-selectin, carcinoma metastasis and heparin: novel mechanistic connections with therapeutic implications. *Braz J Med Biol Res* **2001** 34: 711-7.
338. Barker JN. Adhesion molecules in cutaneous inflammation. *Ciba Found Symp* **1995** 189: 91-101.
339. Yvin J, Alban S, Franz G. Anti-inflammatory and healing medicine based on laminarin sulfate. *PCT Int Appl Patent* **2002** No WO 2002036132.
340. Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FC, Perez M, Singhal AK, Hakomori S, Paulson JC. ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Le^x. *Science* **1990** 250: 1130-2.
341. Puri KD, Finger EB, Springer TA. The faster kinetics of L-selectin than of E-selectin and P-selectin rolling at comparable binding strength. *J Immunol* **1997** 158: 405-13.
342. Alban S, Ludwig RJ, Bendas G, Schön MP, Oostingh G, Radeke HH, Fritzsche J, Pfeilschifter J, Kaufmann R, Boehncke WH. PS3, a novel semisynthetic $\beta 1$ -3 glucan-sulfate, diminishes contact hypersensitivity responses through inhibition of L- and P-selectin functions. *J Clin Invest* **2008** submitted.
343. Ohyama C, Tsuboi S, Fukuda M. Dual roles of sialyl Lewis X oligosaccharides in tumor metastasis and rejection by natural killer cells. *EMBO J* **1999** 18: 1516-25.

344. Alban S, Jeske W, Welzel D, Franz G, Fareed J. Anticoagulant and antithrombotic actions of a semisynthetic β -1,3-glucan sulfate. *Thromb Res* **1995** 78: 201-10.
345. Hahne M, Jager S, Isenmann S, Hallmann R, Vestweber D. Five TNF-inducible cell adhesion mechanisms on the surface of mouse endothelioma cell mediate the binding of leukocytes. *J Cell Biol* **1993** 121: 655-64.
346. Sikorski EE, Hallmann R, Berg EL, Butcher EC. The Peyer's patch high endothelial receptor for lymphocytes, the mucosal vascular addressin, is induced on a murine endothelial cell line by tumor necrosis factor-alpha and IL-1. *J Immunol* **1993** 151: 5239-50.
347. Gosk S, Moos T, Gottstein C, Bendas G. VCAM-1 directed immunoliposomes selectively target tumor vasculature in vivo. *Biochim Biophys Acta* **2008** 1778: 854-63.
348. Vonderheide RH, Springer TA. Lymphocyte Adhesion through Very Late Activation Antigen 4: Evidence for a Novel Binding Site in the Alternatively Spliced Domain of Vascular Cell Adhesion Molecule 1 and an Additional α 4 Integrin Counter-Receptor on Stimulated Endothelium. *J Exp Med* **1992** 175: 1433-42.
349. Saini A, Sella Z, Davies D, Marshall JF, Hart IR. Activation status and function of the VLA-4 (α 4 β 1) integrin expressed on human melanoma cell lines. *Int J Cancer* **1997** 73: 264-70.
350. Sobel M, Fish WR, Toma N, Luo S, Bird K, Mori K, Kusumoto S, Blystone SD, Suda Y. Heparin modulates integrin function in human platelets. *J Vasc Surg* **2001** 33: 587-94.
351. Da Silva MS, Horton JA, Wijelath JM, Blystone LW, Fish WR, Wijelath E, Strand K, Blystone SD, Sobel M. Heparin modulates integrin-mediated cellular adhesion: specificity of interactions with alpha and beta integrin subunits. *Cell Commun Adhes* **2003** 10: 59-67.
352. Diamond MS, Alon R, Parkos CA, Quinn MT, Springer TA. Heparin is an adhesive ligand for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol* **1995** 130: 1473-82.
353. Vorup-Jensen T, Chi L, Gjelstrup LC, Jensen UB, Jewett CA, Xie C, Shimaoka M, Linhardt RJ, Springer TA. Binding between the integrin α X β 2 (CD11c/CD18) and Heparin. *J Biol Chem* **2007** 282: 30869-77.

7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 2-1:	Aufbau der humanen Selektine.....	3
Abb. 2-2:	Sialyl Lewis ^x	6
Abb. 2-3:	Adhäsionskaskade der Leukozyten.....	17
Abb. 2-4:	Die Integrinfamilie.....	18
Abb. 2-5:	Integrinstruktur.....	20
Abb. 2-6:	Struktur und Regulierung.....	23
Abb. 2-7:	Struktur von VCAM-1.....	29
Abb. 2-8:	Der Verlauf der hämatogenen Metastasierung.....	33
Abb. 2-9:	Mögliche Selektin-Tumorzell-Interaktionen.....	45
Abb. 2-10:	Heparin.....	49
Abb. 3-1:	Neubauer improved [®] -Zählkammer.....	77
Abb. 3-2:	Intrazelluläre Hydrolyse des Calcein-AM.....	79
Abb. 3-3:	Hoechst 33342.....	80
Abb. 3-4:	Kopplungsreaktionen von Cyanurchlorid.....	82
Abb. 3-5:	Präparation von sLe ^x -haltigen Bilayern.....	83
Abb. 3-6:	Durchflussapparatur für die Untersuchung der Zelladhäsion unter Strömungsbedingungen.....	85
Abb. 3-7:	Auswertung mittels Imagoquant MultiTrack-AVI-2.....	87
Abb. 3-8:	Fucoidan.....	94
Abb. 4-1:	Zugänglichkeit von immobilisiertem P-Selektin.....	100
Abb. 4-2:	Bindungsfähigkeit humaner Melanomzellen an P-Selektin unter statischen Bedingungen.....	101
Abb. 4-3:	Bindungsfähigkeit muriner Melanomzellen an P-Selektin unter statischen Bedingungen.....	102
Abb. 4-4:	Expression von PSGL-1 auf Tumorzellen.....	103
Abb. 4-5:	Wechselwirkung von NW1539-Melanomzellen mit P-Selektin.....	104
Abb. 4-6:	Wechselwirkung unterschiedlicher Zellen mit P-Selektin.....	105
Abb. 4-7:	Adhäsionsverhalten an P-Selektin unter Flussbedingungen.....	108
Abb. 4-8:	P-Selektin-Expression auf Thrombozyten.....	110
Abb. 4-9:	Wechselwirkung von Zellen mit Thrombozyten.....	111
Abb. 4-10:	Der Einfluss eines P-Selektin-Antikörpers auf die Tumorzell- Thrombozyt-Wechselwirkung.....	112
Abb. 4-11:	Das Adhäsionsverhalten von U937 an P-Selektin in der Gegenwart aktivierter Thrombozyten.....	114
Abb. 4-12:	P-Selektin-Inhibierungspotential von Heparinen und Fucoidan.....	118
Abb. 4-13:	P-Selektin-Inhibierungspotential von Phycarinsulfaten.....	120
Abb. 4-14:	P-Selektin-Inhibierungspotential von Pullulansulfaten.....	121
Abb. 4-15:	P-Selektin-Inhibierungspotential von Curdlansulfaten.....	122
Abb. 4-16:	P-Selektin-Inhibition in Abhängigkeit des Sulfatierungsgrades.....	124
Abb. 4-17:	Intravitalmikroskopische Untersuchung der P-Selektin-abhängigen Interaktion von fluoreszenzmarkierten Thrombozyten mit dem Endothel.....	126

Abb. 4-18:	Der Einfluss von PhyS-4 auf die experimentelle Lungenmetastasierung von B16F10-Melanomzellen.....	130
Abb. 4-19:	Der Einfluss von PhyS-4 auf die P- und E-Selektin-vermittelte Zelladhäsion.....	131
Abb. 4-20:	Inhibierung L-Selektin-vermittelter Zelladhäsion durch PhyS-4.....	133
Abb. 4-21:	Wechselwirkung von B16F10-Melanomzellen mit E-, L- und P-Selektin..	134
Abb. 4-22:	Wechselwirkung von B16F10-Melanomzellen mit L- und P-Selektin sowie Einfluss von PhyS-4.....	136
Abb. 4-23:	Interaktion von ruhenden vs. aktivierten Thrombozyten mit B16F10-Melanomzellen.....	138
Abb. 4-24:	Der Einfluss von Heparin-Natrium 5000 ratiopharm® auf die Wechselwirkung von aktivierten Thrombozyten mit B16F10-Melanomzellen.....	139
Abb. 4-25:	Vergleichende Darstellung der Thrombozytenadhäsion an B16F10-Melanomzellen unter dem Einfluss verschiedener Testsubstanzen.....	140
Abb. 4-26:	Wechselwirkung von B16F10-Melanomzellen mit bEnd3-Endothelzellen unter Flussbedingungen.....	142
Abb. 4-27:	Adhäsionsverhalten von B16F10 an bEnd3-Endothelzellen unter Flussbedingungen.....	143
Abb. 4-28:	VLA-4-Expression auf B16F10-Melanomzellen.....	144
Abb. 4-29:	Adhäsionsverhalten von B16F10-Melanomzellen an bEnd3-Endothelzellen unter Flussbedingungen.....	145
Abb. 4-30:	Adhäsionsverhalten von B16F10-Melanomzellen an mVCAM-1 unter Flussbedingungen.....	147
Abb. 4-31:	Adhäsionsverhalten von B16F10-Melanomzellen an mVCAM-1 unter Flussbedingungen sowie Inhibition durch UFH.....	149
Abb. 4-32:	Bindungsfähigkeit von unfraktioniertem Heparin an B16F10-Melanomzellen.....	151
Abb. 4-33:	Adhäsionsverhalten von B16F10-Melanomzellen an mVCAM-1 unter Flussbedingungen sowie Inhibition durch LMWH.....	152
Abb. 4-34:	Adhäsionsverhalten von B16F10-Melanomzellen an mVCAM-1 unter Flussbedingungen sowie Inhibition durch PhyS-4.....	154
Tab. 2-1:	Der Einfluss von LMWHs auf die Progression von Krebserkrankungen.....	52
Tab. 2-2:	Selektin-unabhängige Heparineffekte.....	57
Tab. 3-1:	Testsubstanzen.....	89
Tab. 3-2:	Heparine.....	95
Tab. 3-3:	Phycarinsulfate.....	96
Tab. 3-4:	Curdlansulfate.....	97
Tab. 3-5:	Pullulansulfate.....	97

8 Veröffentlichungen

Wissenschaftliche Originalarbeiten

Fritzsche J, Hünenbein I, Schumacher G, Alban S, Ludwig RJ, Gille J, Bendas G. In vitro investigation on the selectin binding mechanisms in tumor cell metastasis and their inhibition by heparin. *Int J Clin Pharm Th* **2005** 43: 570-2.

Fritzsche J, Alban S, Ludwig RJ, Rubant S, Boehncke WH, Schumacher G, Bendas G. The influence of various structural parameters of semisynthetic sulfated polysaccharides on the P-selectin inhibitory capacity. *Biochem Pharmacol* **2006** 72: 474-85.

Simonis D, Fritzsche J, Alban S, Bendas G. Kinetic Analysis of Glucan Sulfates Binding to P-Selectin and Its Impact on the General Understanding of Selectin Inhibition. *Biochemistry* **2007** 46: 6156-64.

Alban S, Ludwig RJ, Bendas G, Schön MP, Oostingh G, Radeke HH, Fritzsche J, Pfeilschifter J, Kaufmann R, Boehncke WH. PS3, a novel semisynthetic β 1-3 glucan-sulfate, diminishes contact hypersensitivity responses through inhibition of L- and P-selectin functions. *J Invest Dermatol* **2008** eingereicht.

Fritzsche J, Simonis D, Bendas G. VLA-4 mediated melanoma cell adhesion can be blocked by heparin in vitro: Suggestion of a novel target for antimetastatic approaches. *Thromb Haemost* **2008** eingereicht.

Abstracta/Kongressbeiträge

Fritzsche J, Schumacher G, Zeisig R, Rothe U, Bendas G. A dynamic model system to investigate cancer cell adhesion onto endothelium – first results. *16th Mountain/Sea Liposome Workshop* **2003** Ameland, NL (Kurzvortrag)

Fritzsche J, Alban S, Schumacher G, Bendas G. Investigation of P-selectin blocking substances as promising therapeutic agents. *DPhG Jahrestagung* **2004** Regensburg (Poster)

Schumacher G, Fritzsche J, Hünenbein I, Ludwig R, Zeisig R, Bendas G. Involvement of P-Selectin in the adhesion mechanism of tumour cells to the endothelium in metastasis. *DPhG-Jahrestagung* **2004** Regensburg (Poster)

Fritzsche J, Alban S, Schumacher G, Bendas G. Does heparin represent optimal characteristics for selectin inhibition? *Innovationsforum „Glykane – neuartige Basisstrukturen in Therapie und Diagnose“* **2004** Berlin (Poster)

Bendas G, Christ K, Fritzsche J. The molecular binding characteristics of potent selectin inhibitors analysed by a biosensor-system. *GRK 677 Berichtskolloquium* 18.01.2005, Bonn (Poster)

Fritzsche J, Alban S, Hünerbein I, Schumacher G, Ludwig R, Gille J, Bendas G. In vitro investigation of the selectin binding mechanisms in tumor cell metastasis and their inhibition by heparin. *CESAR Symposium on Novel Approaches for the Discovery and the Development of Anticancer Agents 2005*, Wien, AUT (Kurzvortrag und extended abstract)

Krieger ML, Fritzsche J, Ludwig R, Hünerbein I, Schumacher G, Bendas G. The in vitro investigation of the P-selectin involvement in tumour cell metastasis. *DPhG-Jahrestagung 2005* Mainz (Poster)

Fritzsche J, Simonis D, Alban S, Bendas G. Sulfated polysaccharides as effective selectin inhibitors – correlation between structures and binding kinetics. *GRK 677 Minisymposium 30.03.2006*, Bonn (Poster)

Fritzsche J, Hünerbein I, Krieger ML, Alban S, Ludwig RJ, Gille J, Bendas G. Investigation of selectin involvement in metastatic tumour cell-endothelium interaction and the inhibition by heparin. *24th European Conference on Microcirculation 2006* Amsterdam, NL (Poster)

Fritzsche J, Alban S, Krieger M, Hünerbein I, Ludwig RJ, Gille J, Bendas G. The role of P-selectin in tumour cell metastasis and its inhibition by heparin. *GRK 677 Internationales Symposium 2006* Bonn (Poster)

Fritzsche J, Alban S, Krieger M, Hünerbein I, Ludwig RJ, Gille J, Bendas G. The role of P-selectin in tumour cell metastasis and its inhibition by heparin. *DPhG-Jahrestagung 2006* Marburg (Kurzvortrag)

9 Verfassererklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Bonn, 15.05.2008

Juliane Fritzsche